

# GENÉTICA MÉDICA

X. Estivill Pallejà, V. Volpini Bertrán, M. Milà Recasens, F. Real Arribas y N. Morral Còdol





# Bases moleculares de la herencia

X. Estivill Pallejà

---

## Nueva genética en la práctica médica: del conocimiento a la revolución tecnológica

---

La genética molecular se ha desarrollado de forma extraordinaria durante los últimos 25 años. El descubrimiento de la estructura de doble hélice del *ácido desoxirribonucleico* (DNA), la determinación del paso de la información del gen a la proteína y el conocimiento de la estructura y de los mecanismos de acción de muchas proteínas relevantes en las distintas vías metabólicas o con función estructural, han sido los avances más destacados que se han realizado en el estudio de las bases moleculares de la vida. A este progreso en el campo del conocimiento debe añadirse el desarrollo de la *tecnología del DNA recombinante*, que ha permitido disponer de herramientas de análisis inimaginables hace sólo unos años.

Hasta hace poco, la genética molecular ha estado alejada de las enseñanzas médicas, principalmente debido a que esta rama de la biología se ha desarrollado muy lejos de la práctica clínica, pero también debido a que las aplicaciones médicas de esta disciplina han evolucionado muy rápidamente, sin que haya existido una transmisión académica de los avances realizados a los médicos en formación. Sin embargo, la revolución tecnológica que ha acompañado a la genética molecular durante los últimos años ha permitido la aplicación de esta disciplina al *estudio, diagnóstico, tratamiento y prevención* de las enfermedades humanas. En la actualidad, la genética molecular constituye una disciplina imprescindible para el conocimiento médico, del mismo nivel que la anatomía, la fisiología o la histología.

Las notables aportaciones realizadas en los años cincuenta y sesenta sobre las bases moleculares de la herencia, la estructura del DNA y el descubrimiento del código genético no permitieron, sin embargo, realizar estudios en los organismos superiores (eucariotas) hasta principios de los años setenta. El desarrollo de los métodos de *ingeniería genética* ha permitido disponer de herramientas poderosísimas para el estudio molecular. Entre los avances metodológicos más relevantes debemos destacar: la transcripción de las secuencias del *ácido ribonucleico* (RNA) mensajero, mediante la enzima *transcriptasa inversa*, en *DNA complementario* (cDNA); el empleo de las *enzimas de restricción* que cortan el DNA en fragmentos de distintos tamaños; el método de análisis molecular de *Southern*, para el estudio de cualquier secuencia de DNA con una *sonda* específica; la integración del DNA en el interior de vectores (plásmidos o bacteriófagos), que ha permitido la obtención de recombinantes y la *clonación de genes*, y el análisis de la *secuencia del DNA*. Si bien en genética molecular la mayoría de las técnicas que se utilizan son muy laboriosas, algunas han podido ser automatizadas, como la síntesis de oligonucleótidos (secuencias cortas de nucleótidos), la secuenciación del DNA y la clonación *in vitro* de los ácidos nucleicos.

Con el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante y su aplicación a la medicina, se aislaron los primeros genes humanos (lactógeno placentario y hemoglobina). El estudio de los genes de la hemoglobina ha revelado una variada patología molecular, siendo un modelo útil para el estudio de otros genes. A principios de los años ochenta sólo una veintena de genes humanos habían sido clonados, mientras que en la actualidad la cifra sobrepasa los 3.000 genes.

---

## Genética molecular y patología humana

---

El desarrollo tecnológico experimentado en los años setenta se ha aplicado con éxito para resolver importantes necesidades del estudio y diagnóstico de las enfermedades genéticas. La utilización de las enzimas de restricción y el descubrimiento de los *fragmentos de restricción de longitud polimórfica* (FRLP), permitieron desarrollar el concepto de *genética reversa* o *clonación posicional*, empleando marcadores del DNA para localizar en el genoma los genes responsables de las distintas enfermedades hereditarias que afectan al hombre. Una vez localizado el gen, es posible el diagnóstico directo del defecto molecular o el análisis indirecto sobre la base de la herencia de FRLP próximos al gen mutado.

Las principales consecuencias de los avances en el análisis de la patología molecular se han centrado en la prevención de las alteraciones genéticas hereditarias. El *consejo genético* ofrece a las familias con defectos hereditarios opciones reproductivas adecuadas, gracias al *diagnóstico prenatal* y a la *detección de portadores*. Para un considerable número de enfermedades genéticas es posible establecer el diagnóstico prenatal, en algunos casos sin que el defecto molecular responsable haya sido identificado. A medida que se localizan nuevos genes, aumenta el número de enfermedades genéticas que pueden ser estudiadas desde el punto de vista molecular, existiendo en la actualidad más de 700 procesos cuya localización cromosómica es conocida. Por otra parte, los avances en el análisis de los trastornos hereditarios han sido básicos para el estudio de la patología celular y molecular de las enfermedades adquiridas del genoma, como el cáncer.

Los avances en el campo de la biología molecular han simplificado considerablemente la metodología del aislamiento y de análisis genéticos. Algunas de las enfermedades genéticas, hereditarias o adquiridas, de las que antaño teníamos limitadas nociones sobre sus bases bioquímicas, pueden ser definidas en la actualidad desde el punto de vista molecular con una gran precisión. Los progresos que se están realizando en el conocimiento de la patología molecular humana suponen un crecimiento exponencial en lo que se refiere a la información generada.

---

## Espectro de la patología genética humana

---

En las últimas décadas se ha producido un progreso considerable en los niveles sociales y de atención médica. En los países desarrollados, la mortalidad infantil debida a procesos infecciosos y a malnutrición ha disminuido notablemente. El mejor control sobre la enfermedad infecciosa y nutricional ha permitido descubrir el papel real de los procesos de origen genético (total o parcial) en la morbilidad y mortalidad infantil.

Existen más de 6.000 alteraciones que son heredables de forma dominante, recesiva o ligada al sexo. Las enfermedades genéticas hereditarias afectan al 1% de la población, representan más del 5% del total de los ingresos hospitalarios en pediatría y son una causa importante de mortalidad antes de los 15 años de vida. La mayoría de las enfermedades hereditarias son raras, pero algunas tienen una elevada incidencia, como es el caso de la fibrosis quística, altamente frecuente en la población de raza blanca (1/2.500) en com-

paración con Asia o África. La anemia de células falciformes es la enfermedad hereditaria monogénica más frecuente en la población mundial y tiene una incidencia de 1/40 en África y de 1/400 en la población de raza negra americana. Otras enfermedades como la distrofia muscular de Duchenne, la hemofilia A y el retraso mental ligado al cromosoma X frágil tienen incidencias entre 1/3.000 y 1/10.000.

Las anomalías cromosómicas son la causa de pérdida fetal y malformación congénita mejor definida. La frecuencia de abortos espontáneos en el total de embarazos es del 15%, y en la mitad de los casos existe asociada una anomalía cromosómica. La frecuencia de las anomalías cromosómicas en el nacimiento es del 5,6‰, dando más de un centenar de cuadros clínicos distintos, de los que el más conocido y frecuente es el síndrome de Down (trisomía 21), con una incidencia aproximada de 1 de cada 700 nacimientos.

Las malformaciones congénitas o dismorfologías tienen una elevada incidencia. Malformaciones como la anencefalia, las malformaciones cardíacas, la estenosis pilórica, la hernia inguinal, la escoliosis o la espina bífida tienen una incidencia de entre 2 y 30 de cada 700 nacimientos. La mayoría de estos procesos tienen un importante componente genético y muchos de ellos son de origen poligénico.

Las enfermedades crónicas con un componente genético notable afectan a más del 10% del total de la población adulta. Existe un componente genético variable en las enfermedades comunes que padece la sociedad occidental, como la enfermedad coronaria isquémica, la hipertensión, las enfermedades mentales o la diabetes. En muchos casos, el componente genético que existe en estas enfermedades comunes es probablemente poligénico, como se ha visto ya en enfermedades como la esquizofrenia y la psicosis maniaco-depresiva. Alrededor de un tercio de los pacientes con enfermedad coronaria isquémica tienen algún tipo de anomalía de las lipoproteínas. La hipercolesterolemia familiar se hereda de forma autosómica dominante y afecta a 1 de cada 500 personas en EE.UU.

Los estudios de ligamiento genético, utilizando marcadores del DNA, han permitido la localización cromosómica de un considerable número de genes. En los últimos años se han podido identificar los genes implicados en enfermedades hereditarias, de especial relevancia por lo que respecta a su incidencia y gravedad, como la corea de Huntington, la fibrosis quística, las neurofibromatosis, la distrofia miotónica, la distrofia muscular de Duchenne, la miocardiopatía hipertrófica, el retraso mental ligado al cromosoma X frágil, las ataxias hereditarias, la poliposis de colon familiar, el síndrome de Marfan, etc. Este mismo tipo de estudios ha permitido desvelar el componente genético de otras enfermedades comunes que afectan al hombre y permiten señalar las regiones cromosómicas en que se encuentran los genes implicados en ellas. Enfermedades como la demencia de Alzheimer, la psicosis maniaco-depresiva, la esquizofrenia o el alcoholismo han sido analizadas genéticamente y han podido localizarse las regiones cromosómicas implicadas en ellas, permitiendo el abordaje molecular, aun sin conocer el defecto bioquímico. Cabe esperar que esta metodología permita localizar la mayoría de los genes implicados en patología humana, desentrañando las bases moleculares de las enfermedades comunes que afectan al hombre.

## Enfermedades neoplásicas y patología molecular

La mayoría de las formas de cáncer son el resultado de defectos adquiridos del genoma, aunque en una pequeña parte existen alteraciones que se presentan de forma hereditaria. La investigación en el campo de los *oncogenes* ha ampliado considerablemente nuestros conocimientos sobre la génesis del cáncer. En algunos casos, los oncogenes pueden ser activados mediante mutaciones puntuales que originan la producción de una proteína anómala y la génesis tumoral. En

otras situaciones, la activación de los oncogenes puede ser debida a translocaciones o reordenamientos cromosómicos. Otro mecanismo tumoral es la *homocigiosidad* que se encuentra en el retinoblastoma, el tumor de Wilms y en muchos otros tumores, siempre debido a la herencia de una mutación germinal y a la producción de una mutación somática o un reordenamiento cromosómico consiguientes en una única célula.

Existen varios ejemplos de herencia mendeliana en el cáncer humano: las neurofibromatosis, la poliposis colónica familiar, la neoplasia endocrina múltiple, el síndrome de Von Hippel-Lindau, el síndrome de Li-Fraumeni, el cáncer de mama, el melanoma maligno, etc. Para varios de estos procesos ya se han aislado los genes implicados y se ha podido poner en evidencia su participación en otras neoplasias humanas. Algunos de estos genes son oncogenes, mientras que otros se conocen con el nombre de *antioncogenes*, en los que la transformación neoplásica está relacionada con la lesión en los dos alelos de cada uno de ellos. Otro mecanismo genético de relevancia en el desarrollo tumoral reside en defectos en genes encargados de la reparación del material genético.

## Genética molecular y tratamiento

Hasta hace poco, las enfermedades de origen genético tenían pocas posibilidades terapéuticas, centrándose la mayoría de las acciones médicas en el campo de la prevención. Algunos de los defectos metabólicos pueden ser controlados mediante la administración de la enzima o proteína o previniendo la acumulación de metabolitos tóxicos mediante una dieta apropiada. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado enormes perspectivas para el tratamiento de algunas enfermedades hereditarias. La corrección de los trastornos hereditarios mediante la sustitución del gen deletéreo por el gen normal debe permitir el control directo de las enfermedades genéticas en general, y del cáncer en particular. Los primeros resultados positivos en experimentos en humanos se han obtenido en algunas neoplasias humanas y en el déficit de adenosindesaminasa (ADA). Experimentos en animales de laboratorio permiten augurar un futuro muy esperanzador para la distrofia muscular de Duchenne y para la fibrosis quística, habiéndose aprobado los primeros experimentos en seres humanos en varios países.

La obtención de los productos proteicos mediante ingeniería genética permite su administración terapéutica, constituyendo el tratamiento idóneo para varias enfermedades. La producción industrial mediante ingeniería genética de insulina, factores VIII y IX de la coagulación, hormona del crecimiento, interferones, factor estimulante de colonias granulomonocíticas (GM-CSF) y granulocíticas (G-CSF) eritropoyetina, activador tisular del plasminógeno, vacunas, etc., es ya una realidad, con la extraordinaria ventaja de la pureza de los productos obtenidos, evitando la presencia de agentes infecciosos contaminantes.

Los animales de laboratorio que contienen genes que no les son propios se denominan *transgénicos*. La obtención de estos animales permite el estudio de la expresión de los genes humanos. Por otra parte, también es posible la manipulación de genes en animales de laboratorio, ocasionando lesiones que reproducen enfermedades genéticas humanas, lo que permite disponer de modelos animales experimentales para su estudio.

## Genomas exógenos y patología humana

El aislamiento de los genomas de los organismos que pueden infectar al hombre ha permitido realizar avances considerables sobre la patogenia de los procesos en que se encuentran implicados. Entre estos organismos debe destacarse los virus de las hepatitis B y C, el virus del síndrome de

la inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA) y el papilomavirus humano. El conocimiento de la secuencia de estos virus ha permitido estudiar sus mecanismos de integración en el genoma humano, a la vez que ha facilitado el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación, como la disponible en la actualidad para la hepatitis B, mediante la obtención de la *vacuna recombinante*. Por otra parte, la nueva tecnología permite el diagnóstico genotípico de estos procesos, cuya fidelidad es superior a la de los métodos inmunológicos existentes en la actualidad, además de permitir un diagnóstico del proceso infectivo en sus primeras fases.

## Individualidad del material genético

Los estudios moleculares han puesto de manifiesto la variabilidad individual del material genético. Esta variabilidad permite la aplicación de la genética molecular a estudios antropológicos y de identificación de individuos, de gran relevancia en medicina legal y forense. La posibilidad de amplificar cualquier secuencia de DNA a partir de escaso material genético ha incrementado de forma notable las posibilidades de la genética molecular en este campo, permitiendo el análisis de muestras en parafina o formol.

## DNA y medicina predictiva

Una de las principales consecuencias del enorme progreso en el conocimiento sobre la estructura de los genes humanos y del desarrollo tecnológico experimentado es su aplicación en el diagnóstico de la patología humana. A medida que se progresa en el estudio del mapa del genoma humano, un número mayor de *loci* son accesibles al análisis genotípico, permitiendo estudiar en cada individuo un gran número de enfermedades, la *predisposición* a ellas, determinar el estado de portador y realizar *diagnóstico prenatal* y *presintomático* de los distintos procesos genéticos.

Los avances que se están realizando en genética molecular humana permitirán la predicción de los procesos patológicos que pueden afectar a cada individuo. De este modo, puede decirse que entramos en el período de la *medicina predictiva*, mediante la cual el médico podrá realizar una *medicina preventiva* individual eficaz. Esta nueva situación tiene aspectos éticos de gran relevancia, ya que se plantea la circunstancia de poder diagnosticar enfermedades, para muchas de las cuales todavía no existen posibilidades terapéuticas, mucho antes de que se desarrollen. Desde el punto de vista diagnóstico, los avances que se realicen en este campo dependerán, en gran parte, de la facilidad con la que puedan incorporarse a la práctica clínica los conocimientos que se deriven de las investigaciones.

## Información genética

El DNA es, sin la menor duda, la molécula más importante de la vida. En la cadena del DNA se encuentra la información que determina la estructura de las proteínas, así como las instrucciones para el crecimiento, el desarrollo y la diferenciación celulares. El DNA ha sido el artífice de la evolución de las especies desde el origen de la vida en nuestro planeta hace más de 3 billones de años.

Las células constituyen la forma más pequeña de vida. Las células que contienen un núcleo que almacena el material genético se denominan *eucariotas*, mientras que las células sin núcleo se designan como *procariotas*. En las células eucariotas el DNA se encuentra en estructuras denominadas *chromosomas*. Las células tienen la capacidad de desarrollarse y dividirse y constituyen verdaderas factorías en las que se producen millares de proteínas con distintas funciones en los es-

pacios intracelular y extracelular. Estas distintas funciones definen la especialización celular. Por otra parte, cada una de las moléculas de una célula determinada es capaz de realizar un considerable número de reacciones químicas con moléculas procedentes de otras células.

Las distintas proteínas están formadas por cadenas constituidas por 20 aminoácidos distintos, siendo la secuencia de éstos y la longitud de la cadena la base de la diversidad proteica y polipeptídica. A pesar de que la mayoría de las proteínas son enzimas, muchas tienen una función estructural, y otras actúan como hormonas.

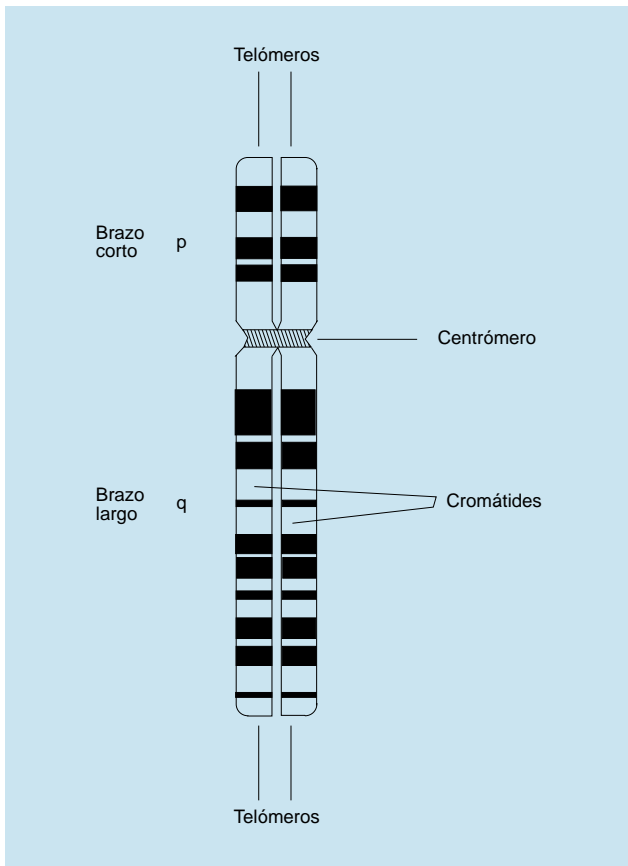
La totalidad de las características que poseemos los seres vivos las hemos heredado de nuestros padres y han sido transmitidas a nosotros desde las postrimerías del origen del hombre. Los experimentos que realizó MENDEL en la década de 1860 permitieron comprobar que las distintas características de un individuo se encuentran bajo el control de dos factores distintos, que hoy conocemos como *genes*, provenientes de cada uno de nuestros padres. Del mismo modo, es posible distinguir entre las características físicas del individuo, a las que denominamos *fenotipo*, y la composición genética exacta de aquél, que se conoce como *genotipo*. De este modo, los genes que se bastan por sí solos para la expresión de la característica que determinan se designan *dominantes*, mientras que aquellos que requieren dos copias para su expresión se denominan genes *recesivos*. El DNA de cada célula es capaz de codificar para más de 50.000 proteínas distintas. Los genes que codifican para estas proteínas se encuentran situados de forma lineal en la cadena del DNA y están empaquetados en los cromosomas. Cada célula de nuestro organismo (somática) tiene 46 cromosomas agrupados en 23 pares; cada par de cromosomas ha sido heredado de cada uno de nuestros progenitores.

## Cromosomas

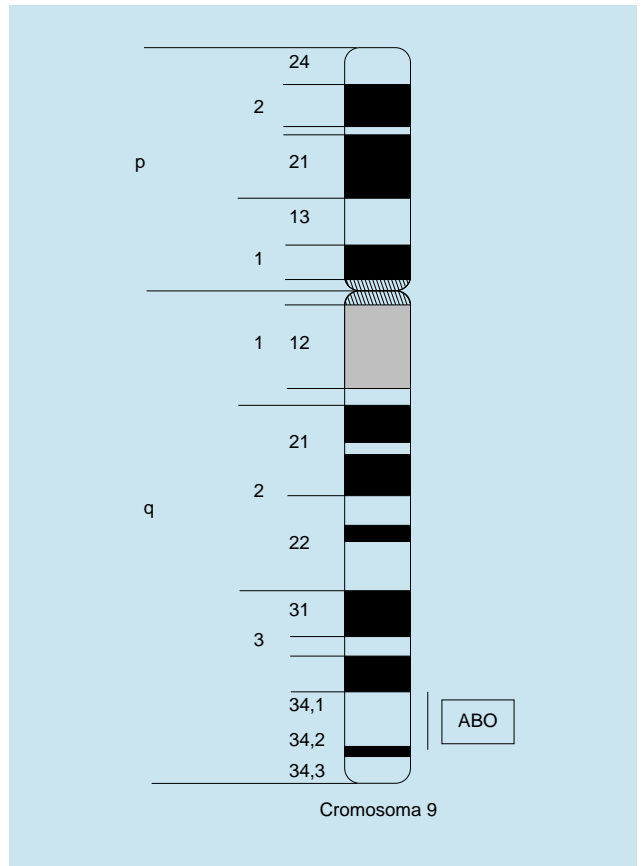
El DNA se encuentra dentro del núcleo celular, organizado en unas estructuras denominadas *chromosomas* (del griego, cuerpos coloreados). Los cromosomas se estudian durante la división celular y, concretamente, durante la *prometáfase* tardía y la *metafase*, ya que es cuando presentan un grado de condensación adecuado que permite su identificación. Un cromosoma típico es una estructura simétrica constituida por dos elementos idénticos, las *cromátides*, cada una de las cuales está formada por una molécula única de DNA de doble hélice con sus proteínas asociadas, que recorre el cromosoma de forma continua de un extremo a otro. Ambas cromátides conectan entre sí en una constricción, denominada *constricción primaria o centrómero*, que resulta crucial para la orientación del cromosoma durante la división celular. A ambos lados del centrómero se sitúan unas estructuras proteicas, visibles sólo mediante el microscopio electrónico, denominadas *cinetocoros*, a las que se asocian las fibras del huso acromático durante la *metafase* y la *anafase* (fig. 9.1).

El número de cromosomas, que se encuentran en forma de *pares de homólogos* (dotación *diploide*, 2n), es constante para todas las *células somáticas*, mientras que las *células germinales* maduras poseen sólo un cromosoma de cada par (dotación *haploide*, n). El número diploide es 46, y está organizado en 23 pares; 22 son *autosomas*, y al par restante se le denomina *gonosomas* o *chromosomas sexuales*, que son diferentes según el sexo: XX para la hembra (sexo *homogamético*) y XY para el varón (sexo *heterogamético*). Cada par de *chromosomas homólogos* posee características morfológicas parecidas y en ambos sus genes contienen información para los mismos caracteres, aunque no necesariamente la información será idéntica, ya que uno tiene origen materno, y otro, paterno.

Si bien todos los cromosomas tienen la misma organización, la forma y el aspecto de cada uno de ellos son distintos, según sean la longitud y la disposición del centrómero, el cual determina dos brazos: uno *corto* y uno *largo* a los que denominamos p y q, respectivamente. En 1960 se normalizó la no-



**Fig. 9.1.** Representación esquemática de un cromosoma durante la metafase, en la que se aprecian las dos cromátides unidas en el centrómero.



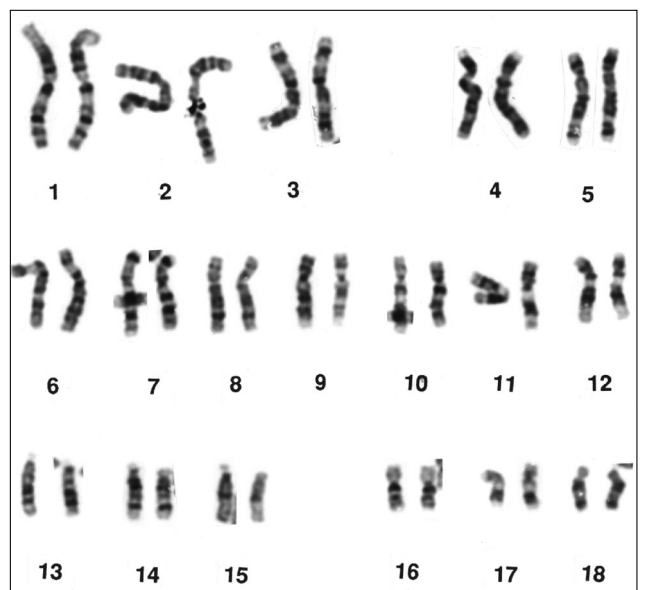
**Fig. 9.2.** Localización del grupo sanguíneo ABO en el brazo largo (q) del cromosoma 9, región 3, banda 4, subbandas 1-2.

menclatura utilizada para cada uno de los cromosomas humanos y en 1971 se estableció un sistema para identificar las regiones y subregiones originadas por las técnicas de *análisis de bandas* (bandeo). Las bandas se definen como una parte del cromosoma que puede identificarse de los segmentos adyacentes, al aparecer más clara o más oscura que éstos, según el método de tinción empleado. El *cariotipo* consiste en la disposición ordenada de los cromosomas según la forma y el tamaño, atendiendo a los criterios de mayor a menor y la localización del centrómero o bien a la técnica de bandeo correspondiente. Por ejemplo, 9q34.12 indica cromosoma 9, brazos largos, región 3, banda 4, subbanda 1-2 (fig. 9.2). En el estudio de un caso determinado, una vez ordenados los cromosomas y comprobado que su número es correcto, los pares homólogos son iguales y su morfología se ciñe a la descrita, se concluye que la muestra se corresponde a un cariotipo normal, cuyo número y fórmula es de 46,XX para la mujer y 46,XY para el varón (fig. 9.3). Los cariotipos son laboriosos y su indicación siempre se basa en criterios clínicos. Los cromosomas se estudian más fácilmente en los linfocitos de sangre periférica, pero cualquier tejido puede ser útil, en particular médula ósea, fibroblastos de piel, amniocitos, etc.

**Estructura de los ácidos nucleicos: DNA y RNA**

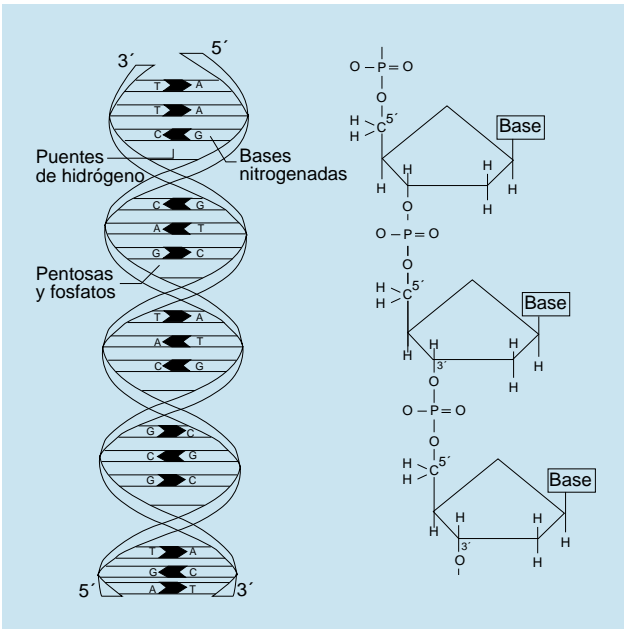
El DNA es una macromolécula muy larga, de doble hebra, formada por un gran número de *desoxirribonucleótidos*, cada uno de los cuales contiene una base nitrogenada, un azúcar y un grupo fosfato. Las bases del DNA son las portadoras de la información genética, mientras que los azúcares y grupos fosfato tienen un papel estructural (fig. 9.4).

El RNA está formado por una sola cadena de *ribonucleótidos*. El azúcar del DNA es la desoxirribosa, mientras que en el RNA es la ribosa. La desoxirribosa se diferencia de la ri-



**Fig. 9.3.** Cariotipo normal humano de un varón.

bosa en que le falta un átomo de oxígeno. Las bases nitrogenadas pueden ser *púricas* o *pirimídicas*; las púricas son la *adenina* (A) y la *guanina* (G), y las pirimídicas, la *citocina* (C) la *timina* (T) y el *uracilo* (U). Un *nucleósido* consiste en una base púrica o pirimídica unidas a un azúcar. Los cuatro nucleósidos del DNA son desoxiadenosina, desoxiguanina, desoxitimidina y desoxicitidina, mientras que los del RNA son adenina, guanina, citosina y uracilo (fig. 9.5).



**Fig. 9.4.** Estructura espacial de la molécula de doble hélice del DNA y organización molecular de éste. A: adenina; G: guanina; T: timina; C: citosina.

### DNA y replicación

La estructura del DNA consiste en un armazón de desoxirribosas unidas a grupos fosfato; esta estructura es invariable a lo largo de toda la molécula. El 5'-hidroxilo (OH) del azúcar de un desoxirribonucleótido se une al 3'-OH del azúcar adyacente mediante un puente fosfodiéster. La parte variable del DNA es la secuencia de las cuatro bases, A, G, T y C. Un extremo de la cadena del DNA tiene un grupo 5'-OH, y el otro extremo, un grupo 3'-OH. La secuencia de bases está determinada en el sentido 5' → 3', que se corresponde a la secuencia de aminoácidos de la proteína en el sentido amino-carboxilo (fig. 9.4).

WATSON y CRICK dedujeron la estructura tridimensional del DNA. La molécula del DNA está formada por dos cadenas de nucleótidos enrolladas alrededor de un eje, las cuales tienen direcciones opuestas. Las bases púricas y pirimídicas se encuentran en el interior de la hélice, mientras que los grupos

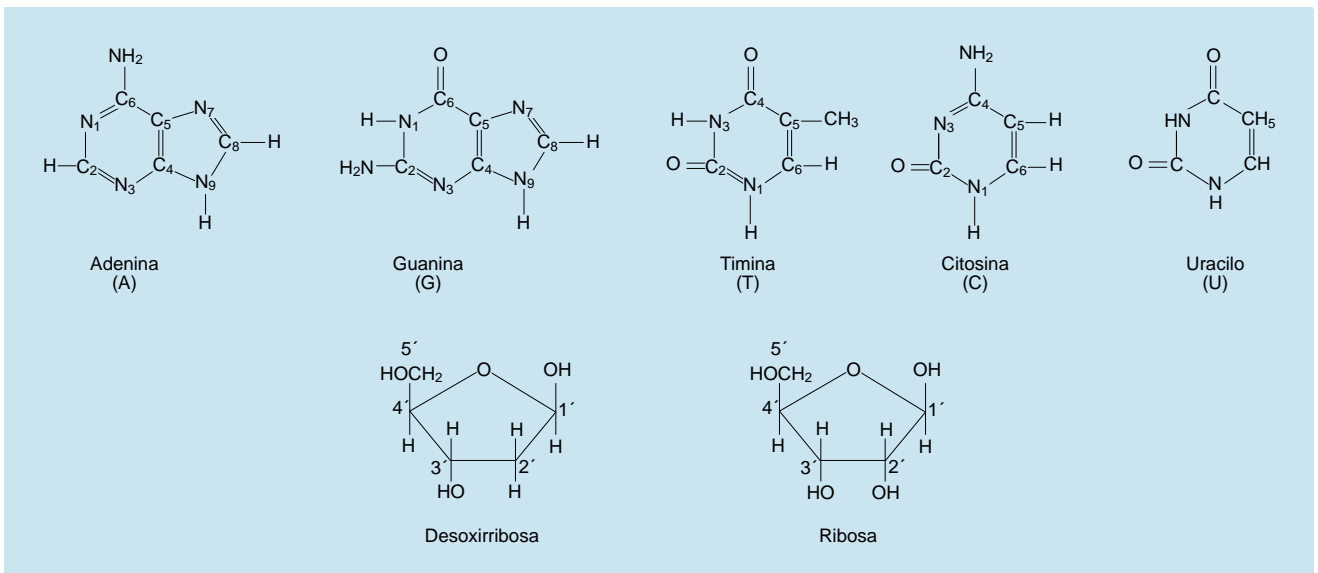
fosfato y los azúcares están en la parte externa. Las dos cadenas se hallan unidas por puentes de hidrógeno entre los pares de bases: la adenina se empareja con la timina, unidas por dos puentes de hidrógeno, mientras que la guanina lo hace con la citosina mediante tres puentes de hidrógeno. La secuencia de bases es la portadora de la información genética (fig. 9.4).

El modelo de doble hélice de WATSON y CRICK sugirió el mecanismo por el cual se produce la *replicación* del DNA, es decir, de cómo se copia el DNA en DNA. El mecanismo consiste en que sólo una de las hebras de cada molécula de DNA hija es sintetizada de nuevo, mientras que la otra es heredada sin cambios en la molécula original. Este tipo de replicación se denomina *replicación semiconservativa*. Las dos hebras de una hélice de DNA se separan con rapidez cuando los puentes de hidrógeno entre las bases se rompen mediante el calor o el tratamiento con una solución alcalina. La replicación del DNA constituye la base de la transmisión de la información genética, es decir, de la herencia.

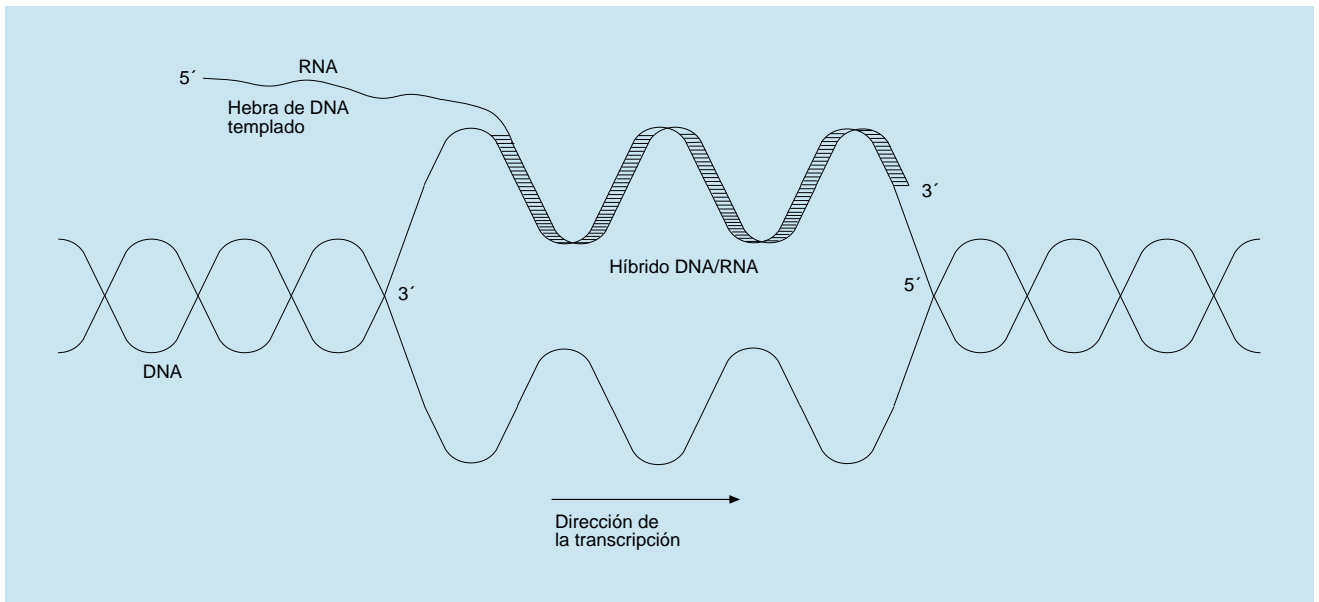
La enzima *DNA-polimerasa I* cataliza la replicación al permitir la incorporación de desoxirribonucleótidos a la cadena de DNA. Éstos deben encontrarse en forma de 5'-dATP, dGTP, dCTP y dTTP, y se unirán al extremo 3'-OH de una cadena de DNA ya existente, la cual ha sido abierta mediante la acción de la *DNA-polimerasa*. Los desoxirribonucleótidos que se incorporen lo harán de forma complementaria a la otra hebra de DNA que actúa como *templado* o molde. La elongación del DNA se realiza en la dirección 5' → 3'. La *DNA-polimerasa I* cataliza la formación del enlace fosfodiéster sólo si la base que se incorpora es complementaria a la que se encuentra en la hebra que actúa como templado.

### RNA y transcripción

Si bien el DNA es la molécula de la herencia, el flujo de la información genética hacia la célula se lleva a cabo mediante el RNA. El RNA se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células eucariotas. Un tipo de RNA, conocido como *RNA mensajero* (mRNA), se encarga de transmitir la información genética para la síntesis proteica. Otras moléculas, como el *RNA de transferencia* (tRNA) y el *RNA ribosómico* (rRNA), están directamente implicadas en el mecanismo de síntesis de las proteínas en el citoplasma. Todas las moléculas de RNA se sintetizan a partir de DNA mediante la acción de las *RNA-polimerasas*. Se define como *transcripción* a la síntesis de mRNA a partir de DNA, mientras que la *traducción* es la *síntesis proteica* a partir del mRNA.



**Fig. 9.5.** Estructura de las cinco bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos y de las pentosas.



**Fig. 9.6.** Mecanismo de la transcripción de DNA en RNA. La enzima RNA-polimerasa cataliza la incorporación de ribonucleótidos complementarios a una de las hebras del DNA que actúa como templado.

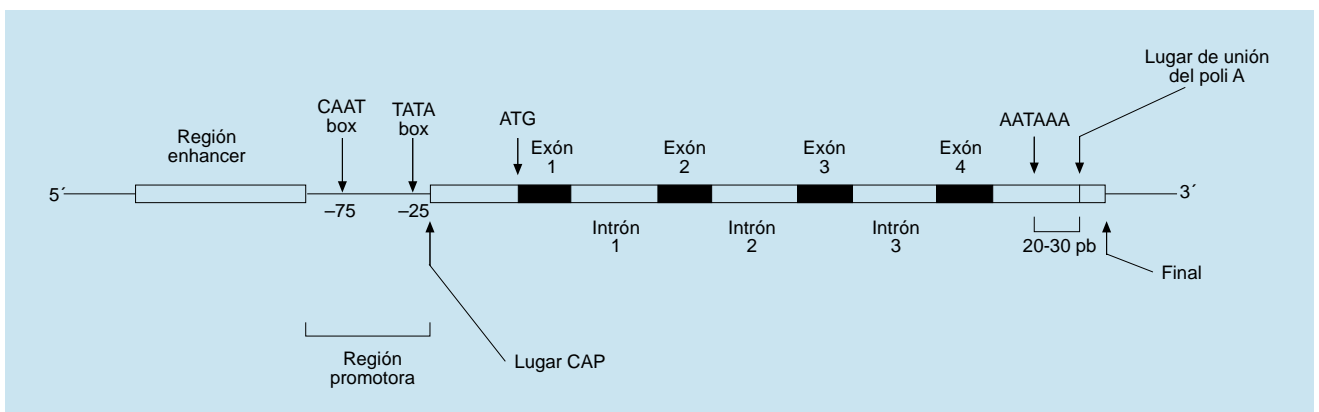
El mRNA es el molde para la síntesis proteica. Para cada gen que se expresa, se produce una molécula de mRNA. La longitud media de una molécula de mRNA es de unas 1.500 bases. El tRNA consiste en moléculas de unos 75 nucleótidos que transportan a los aminoácidos en forma activa hacia el ribosoma para la formación de los péptidos según la información proporcionada por el mRNA molde. Existe un tRNA para cada uno de los 20 aminoácidos distintos. El rRNA es el principal componente de los *ribosomas*. Existen tres tipos de rRNA, que se denominan 23 S, 16 S y 5 S, existiendo una molécula de cada uno de ellos para cada ribosoma. El mRNA es el menos abundante de los tres tipos de RNA, representando sólo el 5% del total del RNA celular. La síntesis del RNA es similar a la del DNA, realizándose también en la dirección 5' → 3' mediante la enzima *RNA-polimerasa*. El DNA que actúa como molde permanece totalmente conservado en el proceso de síntesis del mRNA (fig. 9.6).

El DNA molde contiene regiones denominadas *promotoras* a las que se une la RNA-polimerasa de forma específica, determinando el lugar donde debe empezar la transcripción. Existe una región denominada *TATA box* que consiste generalmente en la secuencia TATAAA y que se encuentra en po-

sición -25, así como otra región conocida como *CAAT box*, que se sitúa a -75 nucleótidos y que contiene la secuencia de bases CAAT. Además de estas regiones reguladoras existen otras, conocidas con el nombre de *enhancers*, que se encuentran a varias *kilobases* (kb) del inicio de transcripción, las cuales pueden estar en situación 3' o 5' del gen (fig. 9.7). Muchos genes tienen en su región 5' secuencias ricas en citosinas y guaninas, conocidas como islas de CpG o HTF, las cuales desempeñan un papel fundamental en la regulación de la expresión de estos genes.

### Código genético

El *código genético* consiste en la relación entre la secuencia de bases del DNA (RNA en el transcrito) y la secuencia de aminoácidos de las proteínas. En 1961 se establecieron las características principales del código genético, que fue descifrado finalmente en 1966 por BRENNER, CRICK y OCHOA. Cada *codón* contiene tres nucleótidos que definen un aminoácido. La mayoría de los aminoácidos están determinados por más de un codón, y 61 codones de las 64 combinaciones posibles de tres bases son los utilizados para codificar los 20



**Fig. 9.7.** Representación esquemática de un gen eucariota típico. Se puede apreciar una región enhancer, la región promotora con el CAAT box y el TATA box, el lugar de unión del poli A, y 4 exones con sus 3 intrones. CAAT box y TATA box corresponden a las secuencias CAAT y TATA que actúan como promotoras de la transcripción. ATG es la secuencia iniciadora correspondiente al aminoácido metionina. El extremo 5' del mRNA se modifica en el proceso de maduración de éste mediante la adición de la estructura CAP.



aminoácidos distintos. El código genético no da lugar a ambigüedad, al referirse un codón a un solo aminoácido. Las tres combinaciones que no determinan ningún aminoácido (UAA, UAG y UGA) se corresponden a señales para la terminación o *stop* de la cadena proteica. Todas las cadenas proteicas empiezan por un aminoácido concreto, la metionina (AUG). El hecho de que varios aminoácidos estén determinados por más de un triplete se conoce como *degeneración* del código genético; ésta minimiza el efecto de posibles mutaciones, las cuales podrían dar lugar a la terminación de la cadena proteica (tabla 9.1).

El código genético es universal, aunque se han encontrado variantes en el DNA mitocondrial y en especies como los ciliados. Los principales cambios hallados en el DNA mitocondrial consisten en que el codón UGA se lee como señal para triptófano; AGA y AGG son señales de terminación en lugar de ser codones para arginina, y AUA se lee como codón para metionina en lugar de isoleucina. Con excepción de estas pequeñas variantes, el código genético ha permanecido

prácticamente invariable en los más de 3 billones de años de evolución del hombre, desde las formas más elementales de vida como las bacterias.

### Estructura génica: del DNA a la proteína

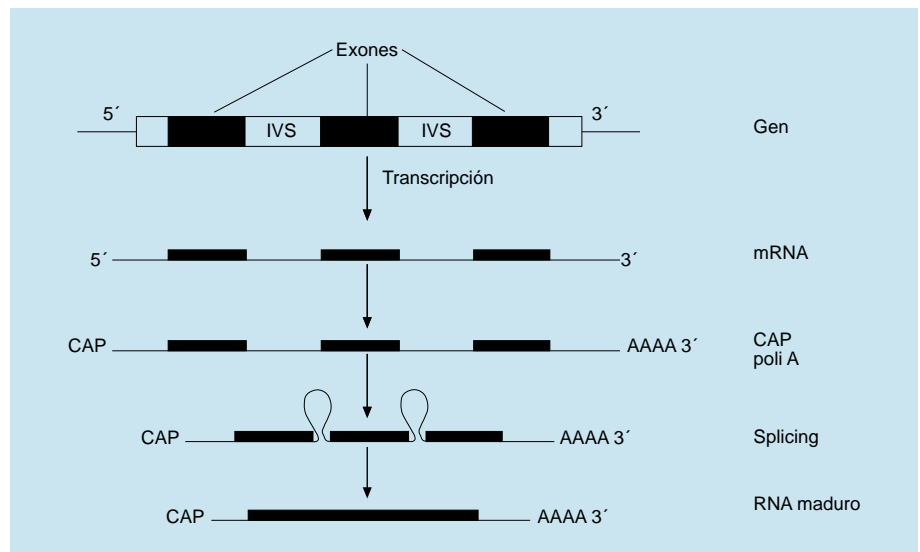
La mayoría de los genes de los mamíferos que se han aislado hasta la actualidad tienen regiones codificantes (*exones*) interrumpidas por regiones no codificantes (*intrones*). Los exones contienen las secuencias específicas para la cadena polipeptídica. Los intrones se encuentran en las regiones no codificantes y no son traducidos en proteína. El número de exones e intrones varía según la longitud del gen. La transcripción origina un largo mRNA precursor que se corresponde al gen entero, incluyendo intrones y exones. Esta molécula sufre varias modificaciones en el interior del núcleo celular antes de pasar al citoplasma. Los intrones son eliminados y los exones se religan de forma precisa para formar una molécula perfecta, que es el mRNA maduro. Este proceso se denomina *splicing* (fig. 9.8). Las primeras bases de un intrón en el extremo 5' son siempre GT, mientras que las últimas bases en el extremo 3' son AG. El mecanismo preciso mediante el cual los intrones son eliminados y los exones se unen es todavía desconocido. Además de esta importante modificación, se producen otros cambios en el interior del núcleo, dos de los cuales son esenciales para poder obtener un mRNA maduro. El primero es la modificación del extremo 5' mediante la adición de la estructura conocida como CAP, y el segundo consiste en la adición, en el extremo 3', de un largo residuo de adeninas designado *poli A*. El lugar de unión del poli A se relaciona con la secuencia AATAAA, denominada *señal de poliadenilación* (fig. 9.8).

El mRNA en el citoplasma actúa de molde para la síntesis proteica. Los distintos tRNA presentan especificidad para los diferentes aminoácidos, teniendo tres bases (*anticodón*) complementarias al codón respectivo del mRNA para cada aminoácido. La síntesis proteica se realiza en los ribosomas, los cuales están formados por dos subunidades. La síntesis se inicia cuando un ribosoma se une a la región en la que existe un codón de iniciación o AUG. Un tRNA se une a este codón y seguidamente lo hace otro tRNA, formándose un enlace peptídico entre los aminoácidos aportados por estos tRNA. El primer tRNA se libera y el proceso se repite sucesivamente en la dirección 5' → 3' hasta completar toda la *traducción* proteica. La síntesis finaliza cuando se llega a un codón de terminación UAA, UAG o UGA. Posteriormente la cadena peptídica se libera del ribosoma, así como el mRNA (figs. 9.9 y 9.10).

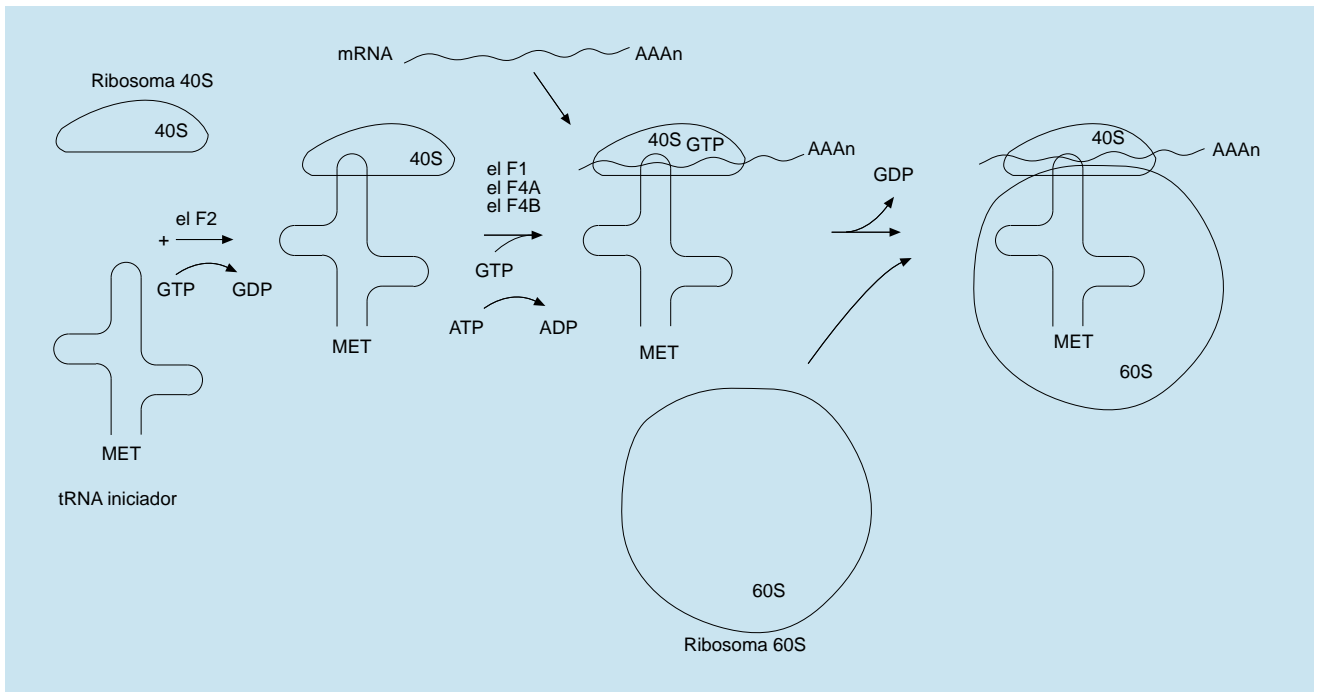
**TABLA 9.1.** El código genético según la información contenida en el RNA mensajero

Primera posición (extremo 5')	Segunda posición				Tercera posición (extremo 3')
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

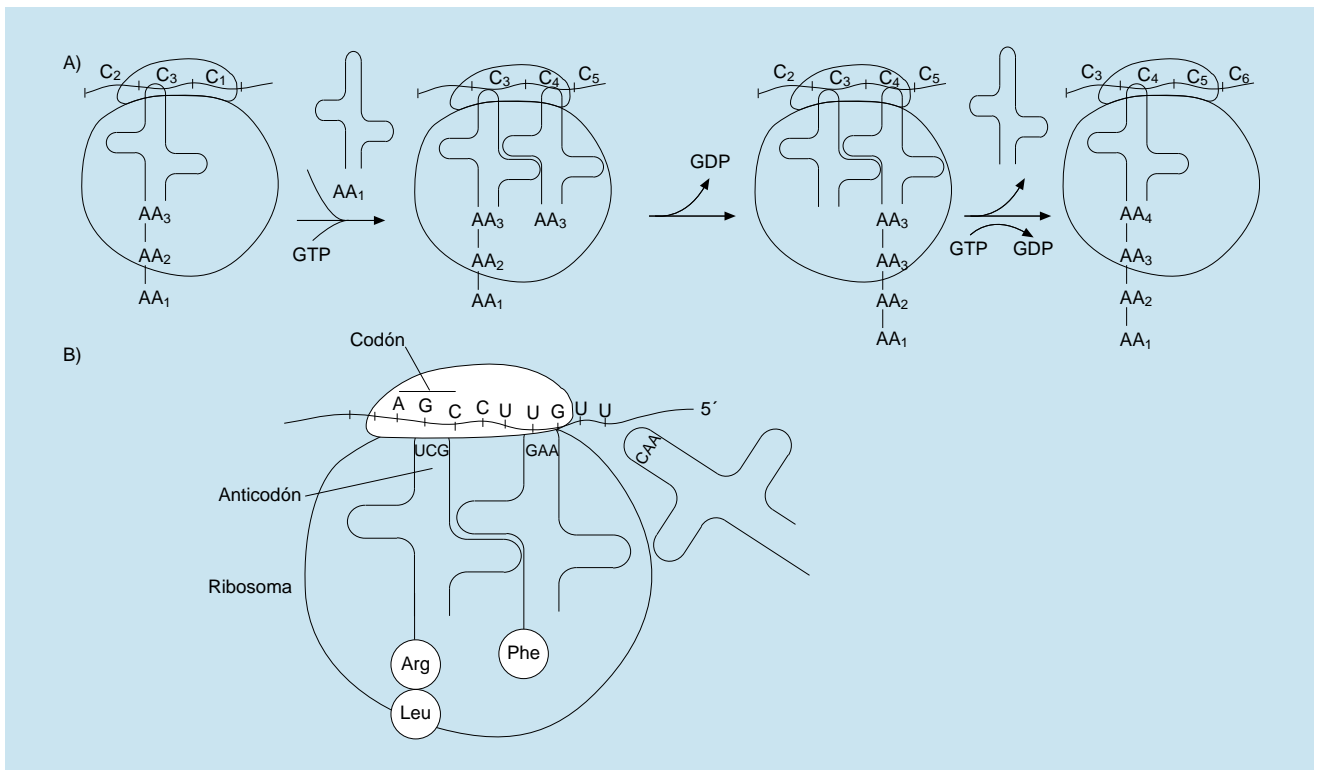
A: adenina; C: citosina; U: uracilo; G: guanina; *stop*: terminación; Ala: alanina; Arg: arginina; Asn: asparagina; Asp: ácido aspártico; Cys: cisteína; Gln: glutamina; Glu: ácido glutámico; Gly: glicina; His: histidina; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Lys: lisina; Met: metionina; Phe: fenilalanina; Pro: prolina; Ser: serina; Thr: treonina; Trp: triptófano; Tyr: tirosina; Val: valina.



**Fig. 9.8.** Maduración del mRNA: unión del CAP y el poli A y mecanismo de splicing. IVS: intervening sequence o intrón.



**Fig. 9.9.** Representación esquemática del inicio de la traducción proteica. El primer tRNA lleva el aminoácido metionina y se une a la subunidad ribosómica 40S, a la que se incorporan posteriormente el mRNA y la unidad ribosómica 60S. F2, F1, F4A y F4B: factores proteicos de inicio de la traducción; GTP: guanosintrifosfato; GDP: guanosindifosfato; ATP: adenosintrifosfato; ADP: adenosindifosfato; AAAn: cadena de aminoácidos; MET: metionina. (Modificada de KAPLAN JC y DELPECH M. Biologie moléculaire et médecine. París, Flammarion, 1989; 72.)



**Fig. 9.10.** Mecanismo de elongación de la proteína (A) y esquema del codón del mRNA y del anticodón del tRNA en la síntesis proteica (B). C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>: codones; AA<sub>1</sub>-AA<sub>n</sub>: aminoácidos; AGC, CUU, GUU: codones; UCC, GAA, CAA: anticodones; GTP: guanosintrifosfato; GDP: guanosindifosfato. Arg: arginina; Phe: fenilalanina; Leu: leucina. (Modificada de KAPLAN JC y DELPECH M. Biologie moléculaire et médecine. París, Flammarion, 1989; 72.)

# Vida celular: ciclo de las células

## Mitosis y cromosomas

La *mitosis* consiste en la división celular mediante la cual una célula origina dos células hijas idénticas. La división mitótica sucede en todas las células del embrión y continúa a un ritmo menor en la mayoría de los tejidos, con excepción de las células finitas, como las neuronas. De este modo, la mitosis es fundamental para la formación y el mantenimiento de los tejidos. La mitosis es un proceso rápido que dura en las células de los mamíferos entre 20 y 60 min, mientras que el paso previo en el que se produce la replicación del DNA tarda entre 6 y 8 h.

Se han definido cinco estadios en la vida celular: interfase, profase, metafase, anafase y telofase. La *interfase* se corresponde al período de no división celular. Este estadio incluye los períodos de G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>. La replicación del DNA sucede en la fase S, de forma que el núcleo en fase G<sub>2</sub> tiene el doble número de cromosomas que en la fase G<sub>1</sub>. Cada cromosoma tiene su propio patrón de síntesis de DNA, y algunos segmentos se replican antes que otros. A medida que la célula se prepara para la división, los cromosomas se condensan y se hacen visibles. Es en este momento cuando empieza la *profase*. Cada cromosoma consiste en un par de *cromátides hermanas* que se encuentran juntas, unidas en el centrómero. En este estadio de profase se produce el intercambio de material genético entre las cromátides hermanas, así como la división del *centríolo*, migrando cada elemento hacia polos opuestos de la célula. La *metafase* comienza cuando los cromosomas han alcanzado su máxima contracción. En este estadio los cromosomas migran hacia la zona ecuatorial de la célula, y unos microtúbulos unen el centrómero de cada cromosoma con los centriolos. La *anafase* empieza cuando los centrómeros se dividen, separándose el par de cromátides y convirtiéndose en cromosomas hijos. El huso cromático se contrae atrayendo a los cromosomas hijos hacia los polos de la célula. La *telofase* se inicia en el momento en que los cromosomas hijos han alcanzado cada polo celular. El citoplasma se divide, los cromosomas se desenrollan y la membrana nuclear vuelve a su estadio inicial.

La mitosis da origen a dos células con una constitución genética idéntica a la célula madre. Es posible que durante la mitosis se produzca *recombinación somática* (frente a la *meiótica*, que veremos más adelante), en la que se intercambia material genético entre los cromosomas homólogos, pudiendo dar lugar a homocigosidad para un *locus* determinado en esta célula, mientras que el resto del organismo es heterocigoto. Este fenómeno tiene gran relevancia en la génesis de las neoplasias y está relacionado con la pérdida de los genes conocidos como *supresores o antioncogenes*.

## Meiosis y recombinación

La *meiosis* consiste en la división del número *diploide* de cromosomas somáticos para dar una célula *haploide* (división reduccional), de forma que cada gameto tiene un miembro de cada par de cromosomas. La reducción en el número de cromosomas se consigue mediante la división celular meiótica. La fusión de un espermatozoide y un óvulo determina la restauración del número diploide de cromosomas en el huevo fertilizado. La división meiótica ocurre sólo en las células germinales. En la *meiosis* se producen dos divisiones sucesivas, la primera y la segunda divisiones meióticas, en las cuales el DNA se replica sólo una vez, antes de la primera división.

La *profase* de la *primera división meiótica* consta de cinco estadios: leptonema, cigonema, paquinema, diplonema y diacinesis. El *leptonema* se inicia con la primera aparición de

los cromosomas. En este estadio cada cromosoma consiste en un par de cromátides hermanas. Los cromosomas homólogos se emparejan durante el *cigonema*. Durante el *paquinema* se produce la condensación cromosómica y aparece el patrón de bandas similar al observado durante la mitosis. Cada cromosoma consiste en dos cromátides, por lo que cada bivalente es una tétrada de cuatro hebras. Durante el *diploonema* los bivalentes empiezan a separarse, aunque los centrómeros no se separan y las dos cromátides de cada cromosoma permanecen juntas. En esta separación se producen contactos entre distintos puntos que se denominan *quiasmas*. En este momento pueden suceder los fenómenos de *recombinación meiótica* entre los cromosomas homólogos. Las cromátides que han intercambiado material genético se denominan *recombinantes*. Se produce una media de 50 quiasmas por célula. La *diacinesis* es la fase final de la profase en la que los cromosomas se encuentran más condensados.

La *metafase* empieza con la desaparición de la membrana nuclear y la movilización de los cromosomas hacia el ecuador celular. En la *anafase* los cromosomas se separan y se dirigen hacia ambos polos celulares. El citoplasma se divide y cada célula consiste en 23 cromosomas, cada uno de los cuales tiene un par de cromátides, que se diferencian entre sí en las recombinaciones que se hayan producido.

La *segunda división meiótica* se produce tras la primera sin que exista período de interfase entre ambas. Como en la mitosis, los centrómeros se dividen y las cromátides hermanas se dirigen hacia los polos opuestos y dan lugar a células hijas que son *haploides*, es decir, tienen la mitad de cromosomas que la célula madre.

Debido a que los cromosomas se distribuyen de forma independiente durante la meiosis, existen 2<sup>23</sup> combinaciones distintas en los gametos de cada progenitor, lo que significa 2<sup>46</sup> posibles combinaciones en el huevo fecundado. La recombinación genética implica un incremento aún mayor en la variabilidad. De este modo, la *gametogénesis* proporciona al cigoto una información genética única, gracias a la distribución independiente de los cromosomas maternos y paternos, así como a la recombinación genética que se produce.

## Gametogénesis y fertilización

La *espermatogénesis* se produce en los túbulos seminíferos del varón a partir de la madurez sexual y dura unos 75 días. Las espermatogonias son las células madre para la formación de espermatozoides. El espermatozocito primario sufre la primera división meiótica para producir dos espermatozocitos secundarios, cada uno de los cuales contiene 23 cromosomas. Estas células sufren la segunda división meiótica, dando origen cada una de ellas a dos espermátides, las cuales madurarán hasta formarse dos espermatozoides maduros (de cada célula germinal se generan cuatro gametos).

La *ovogénesis* es un proceso que se encuentra ya finalizado en el momento del nacimiento. Las ovogonias, que derivan de las células germinales, son las células centrales del desarrollo del folículo. Las ovogonias se han transformado en *ovocitos primarios* alrededor del tercer mes del desarrollo fetal. Estos ovocitos primarios se encuentran en situación de profase y permanecen en ella hasta la madurez sexual. La primera división meiótica se completa con la maduración y liberación del folículo a la trompa de Falopio. En la primera división meiótica el citoplasma se divide de forma desigual, produciéndose un ovocito secundario que retiene la mayor parte del citoplasma de la célula original, mientras que el primer cuerpo polar no contiene casi citoplasma. La segunda división meiótica finaliza tras la fertilización en la trompa de Falopio y da como resultado la formación del óvulo y del segundo cuerpo polar. De este modo, mientras que la espermatogénesis produce cuatro espermatozocitos viables, la ovogénesis origina un óvulo único y tres corpúsculos polares. La fertilización se produce generalmente en la trompa de Falopio. Una vez ha penetrado el espermatozoide en el óvulo,

éste completa la segunda división meiótica, y luego se funden para formar el cigoto, iniciándose así la embriogénesis.

### Bibliografía especial

CONNOR JM, FERGUSON-SMITH MA. Essential medical genetics. 4.<sup>a</sup> ed, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1993.

McKUSICK VA. Mendelian inheritance in man. Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes. 10.<sup>a</sup> ed, Baltimore, Johns Hopkins University Press, 1992.

VOGEL F, MOTULSKY AG. Human genetics. Problems and approaches. 2.<sup>a</sup> ed, Berlín, Springer, 1986.

WEATHERALL DJ. The new genetics and clinical practice. 3.<sup>a</sup> ed, Oxford, Oxford University Press, 1991.

# Herencia y enfermedad

X. Estivill Pallejà y V. Volpini Bertrán

Existen más de 6.000 defectos genéticos que siguen un patrón de herencia mendeliana y que dependen de un solo gen. Estos procesos comprenden las alteraciones de *herencia dominante, recesiva o ligada al sexo*. La mayoría de las enfermedades hereditarias son raras consideradas aisladamente; sin embargo, como grupo de enfermedades constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad. Por otra parte, algunas enfermedades hereditarias tienen una considerable incidencia, como es el caso de la hipercolesterolemia familiar, la poliquistosis renal del adulto, la fibrosis quística, la anemia de células falciformes y el retraso mental ligado al cromosoma X frágil.

Las enfermedades crónicas con un sustrato genético notable afectan a más del 10% de la población adulta. Existe un componente genético variable en las enfermedades comunes que padece la sociedad occidental y la mayoría de las formas de cáncer son el resultado de defectos adquiridos del genoma.

Hay enfermedades bastante frecuentes para las que existe una mayor susceptibilidad genética. Entre ellas cabe destacar la epilepsia, la diabetes, la enfermedad coronaria y las enfermedades autoinmunes. En muchos casos el componente genético es probablemente poligénico, como se ha podido observar en enfermedades como la esquizofrenia y las psicosis maniaco-depresivas. Alrededor de un tercio de los pacientes con enfermedad coronaria tienen algún tipo de anomalía de las lipoproteínas.

Finalmente, la existencia de varios genes responsables de una misma enfermedad, o la presencia de diversas mutaciones en el mismo gen que dan lugar a cuadros clínicos distintos, plantea el tema de la heterogeneidad genética y molecular.

por diferentes individuos de una población. Un *locus* es polimórfico si el alelo más frecuente no supera el 90-95% del total de ellos, en la población considerada. Una combinación de alelos de uno o más *loci* de un individuo constituye un *genotipo*, correspondiendo el *fenotipo* a su manifestación (expresión) en el organismo. Para un determinado *locus*, si los dos alelos respectivos de ambos cromosomas homólogos son idénticos, se trata de un genotipo homocigoto (1/1) (para dicho *locus*); si son distintos, es un genotipo heterocigoto (1/2).

La interacción de los dos alelos (1/2) de un gen o *locus* para constituir un fenotipo (*interacción intragénica*) responde a las clásicas relaciones mendelianas de *dominancia y recesividad*. Existe *dominancia completa* (1 > 2) cuando un fenotipo de (1/2) es el mismo de (1/1), pero distinto al de (2/2). Al alelo 1 se lo denomina dominante, y al 2, recesivo. Si el fenotipo de (1/2) es *intermedio* al de (1/1) y (2/2) se habla de *dominancia incompleta o semidominancia*. Si los efectos de 1 y 2 no se mezclan en el heterocigoto y cada alelo contribuye al fenotipo, se trata de una *herencia codominante*.

Los alelos de los *loci* de los cromosomas sexuales (X,Y) presentan el mismo tipo de relaciones de dominancia-recesividad en las mujeres (X/X), pero no en los varones (X/Y), que sólo presentan un alelo (*hemisigotos*), tanto si el *locus* es del cromosoma X (*herencia ligada al sexo*) como del cromosoma Y (*herencia holandrica*).

Para distinguir los alelos de un gen cuya alteración causa una enfermedad hereditaria, atendiendo a sus relaciones de dominancia o recesividad, se suele seguir una sencilla nomenclatura: *D* indica un alelo deletéreo dominante, *d* indica un alelo recesivo y + se refiere al alelo *normal* o *salvaje*. En la [tabla 9.2](#) se relacionan algunas de las enfermedades hereditarias monogénicas más frecuentes que afectan al hombre.

## Enfermedades monogénicas: patrones de herencia

Las enfermedades de herencia monogénica corresponden a las ocasionadas principalmente por la alteración de un solo gen, heredándose según los clásicos modelos mendelianos.

El término *locus* se refiere a una *posición definida* de una secuencia de DNA determinada en un cromosoma. Si la mencionada secuencia corresponde a un gen, hablaremos de *locus genético*. Los organismos diploides (2n), entre los que se encuentra el hombre, poseen dos formas aproximadamente iguales de cada cromosoma autosómico: los cromosomas homólogos. En éstos, los diferentes *loci* pueden estar ocupados en posiciones equivalentes por secuencias o formas génicas distintas: los *alelos*. Un individuo diploide sólo puede presentar dos alelos para cada *locus*, pero un *locus* puede presentar varios alelos (sistema polialélico) portados

## Herencia autosómica dominante

Se conocen más de 1.500 defectos que se heredan de forma autosómica dominante. Los heterocigotos (+/D) padecen la enfermedad, con lo que la presencia de una sola copia del alelo "enfermo" (D) es suficiente para que la enfermedad se manifieste. Los homocigotos (D/D) pueden estar más gravemente afectados o ser indistinguibles de los heterocigotos. En la mayoría de los procesos no se citan casos de homocigotos, quizá debido a la escasa incidencia de las entidades o a que los homocigotos mueren antes de nacer.

En la [figura 9.11](#) se muestra la genealogía de una enfermedad autosómica dominante. Pueden establecerse los siguientes criterios esenciales para distinguir un proceso de herencia dominante: *a)* los individuos enfermos tienen su padre o su madre también afectados por el proceso, hablándose de un patrón de herencia *vertical*; *b)* ambos sexos tienen el mismo riesgo de padecer el defecto genético y de transmitirlo a la descendencia; *c)* cuando un individuo afectado se empareja con uno sano de la población general, tiene un riesgo de

**TABLA 9.2.** Algunas de las principales enfermedades monogénicas hereditarias

*Autosómicas dominantes*

Hipercolesterolemia familiar  
 Poliquistosis renal del adulto  
 Corea de Huntington  
 Neurofibromatosis tipo 1  
 Neurofibromatosis tipo 2  
 Déficit de proteínas C y S (trombofilia)  
 Distrofia muscular facioescapulohumeral  
 Enfermedad de Alzheimer  
 Neuroblastoma  
 Tumor de Wilms  
 Síndrome de Von Hippel-Lindau  
 Neoplasia endocrina múltiple  
 Síndrome de Gilles de la Tourette  
 Melanoma maligno familiar  
 Síndrome del nevo basocelular  
 Ataxia espinopontocerebelosa  
 Síndrome de Marfan  
 Distrofia miotónica  
 Esclerosis tuberosa  
 Esferocitosis hereditaria  
 Porfiria aguda intermitente  
 Osteogénesis imperfecta  
 Enfermedad de Von Willebrand  
 Estenosis subaórtica hipertrófica idiopática  
 Otosclerosis  
 Exostosis múltiple  
 Poliposis colónica  
 Acondroplasia

*Autosómicas recesivas*

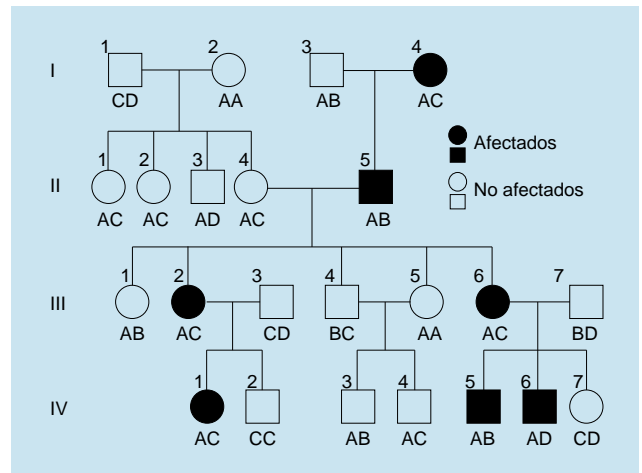
Fibrosis quística  
 Anemia de células falciformes  
 Betatalasemia  
 Alfatalasemia  
 Déficit de  $\alpha_1$ -antitripsina  
 Ataxia de Friedreich  
 Fenilcetonuria  
 Enfermedad de Wilson  
 Hemocromatosis  
 Homocistinuria  
 Cistinuria  
 Fiebre mediterránea familiar  
 Enfermedad de Tay-Sachs  
 Hiperplasia suprarrenal congénita  
 Anemia de Fanconi  
 Poliquistosis renal infantil  
 Xeroderma pigmentoso  
 Leucodistrofia metacromática  
 Aтроfias musculares espinales infantojuveniles  
 Galactosemia  
 Distrofias musculares de cinturas

*Recesivas ligadas al cromosoma X*

Hemofilia A  
 Hemofilia B  
 Distrofia muscular de Duchenne-Becker  
 Enfermedad granulomatosa crónica  
 Déficit de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa  
 Retraso mental ligado al cromosoma X frágil  
 Enfermedad de Fabry  
 Síndrome de feminización testicular  
 Daltonismo  
 Síndrome de Lesch-Nyhan  
 Enfermedad de Emery-Dreifuss  
 Enfermedad de Norrie  
 Enfermedad de Wiskott-Aldrich

*Heterogeneidad genética*

Albinismo (AR, XR)  
 Ataxia-telangiectasia (AD, AR)  
 Retinitis pigmentaria (AD, AR, XR)  
 Síndrome de Ehlers-Danlos (AD, AR, XR)  
 Seudoxantoma elástico (AD, AR)  
 Inmunodeficiencia grave combinada (XR, AR)  
 Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (AD, AR, XR)  
 Aтроfias musculares espinales del adulto (AD, AR, XR)  
 Ictiosis (AD, AR, XR)  
 Sordera (AD, AR)



**Fig. 9.11.** Árbol genealógico de una familia con miembros afectados de corea de Huntington, enfermedad de herencia autosómica dominante, en la que se aprecia un patrón de herencia de tipo vertical. En esta familia la enfermedad se hereda ligada al haplotipo A.

1/2 de tener hijos afectados por la enfermedad, y *d*) los hijos normales de una pareja en la que uno de los miembros padece el defecto, no lo transmitirán a su descendencia (salvo en casos de no penetrancia, véase más adelante).

Es característico que las enfermedades genéticas dominantes presenten una expresión variable, de forma que en ciertos casos existe una manifestación florida, mientras que otros pasan casi inadvertidos. Esta circunstancia puede suceder incluso en el seno de una misma genealogía. La falta completa de expresión del defecto dominante en un individuo se conoce como ausencia de *penetrancia*. Un ejemplo claro lo constituye el de un individuo que no padece la enfermedad, pero que es hijo y padre de afectados por ella, con lo que necesariamente es portador heterocigoto (+/D) del alelo mutado. La presencia de otros muchos genes *modificadores* (*genes menores*) que interactúan con el ambiente y con el gen *fundamental* del proceso (*gen mayor*) se aduce usualmente para explicar los fenómenos de penetrancia y expresividad variables (véase Penetrancia e interacción genética, más adelante).

Una determinada proporción (*X*) de los individuos enfermos (+/D) que aparecen en cada generación (incidencia, *I*) se debe a mutaciones nuevas. La probabilidad de que un alelo *normal* (+) mute ocasionando un *deletéreo* (D), en la unidad de tiempo de una generación, es lo que se conoce como tasa de mutación recurrente o, simplemente, *tasa de mutación* ( $\mu$ ). En el caso de mutaciones puntuales puede considerarse una tasa de mutación reversible recíproca ( $D \rightarrow +$ ), mucho más infrecuente (no así en las deleciones, que son procesos irreversibles). La proporción de mutaciones *de novo* que se producen en las enfermedades dominantes está en relación inversa con la capacidad de los individuos afectados de tener hijos que puedan llegar a la edad adulta y reproducirse. Si definimos la *penetrancia* (*P*) como la probabilidad de que se manifieste un fenotipo determinado (en este caso, la enfermedad), dado que se posee un genotipo determinado, y la *eficacia biológica* o *fitness* (*f*) como la probabilidad relativa de dejar descendientes, es posible encontrar expresiones matemáticas que relacionen todas las variables mencionadas, atendiendo a complejos cálculos de genética de poblaciones. De este modo, la *pérdida de los alelos deletéreos* (D) (selección en contra) se verá compensada por el "aporte" debido a la mutación *de novo*, llegándose a una situación final de equilibrio. Según lo mencionado, la proporción de individuos enfermos debidos a mutaciones *de novo* (*X*) será:

$$X = 2 \mu / I = (1 - f)P \quad [1]$$

AD: autosómica dominante; AR: autosómica recesiva; XR: recesiva ligada al sexo.



siendo  $f$  la eficacia biológica de los afectados por la enfermedad. Obsérvese asimismo que:

$$I = 2 \mu / (1 - f) P \quad [2]$$

En la esclerosis tuberosa, proceso autosómico dominante, si consideramos una penetrancia  $P = 0,9$  y una  $f = 0,25$  según [1], resulta:

$$X = 67,5\%$$

En el caso de que la mutación *de novo* se haya producido en una célula germinal de uno de los padres, sólo el hijo afectado transmitirá la enfermedad a la mitad de su descendencia, mientras que sus otros hermanos y sus propios padres, serán normales. En una enfermedad que ocasione esterilidad ( $f = 0$ , alelo  $D$ , *letal* en términos de genética de poblaciones), todos los casos ( $+D$ ) serán debidos a mutaciones *de novo*:

$$I = 2 \mu; X = 1$$

considerando una penetrancia  $P = 100\%$ , al sustituir en [1] y [2]. En procesos como la corea de Huntington, en la que la enfermedad se manifiesta en la edad media de la vida, los casos debidos a nuevas mutaciones representan menos del 5% del total.

### Herencia autosómica recesiva

Se conocen más de 1.000 defectos que se heredan de forma autosómica recesiva, en la que únicamente los homocigotos ( $d/d$ ) manifiestan la enfermedad y los padres de los individuos enfermos son *portadores obligados* o *heterocigotos* ( $+/d$ ), fenotípicamente normales. El 25% de los hijos de una pareja portadora serán genotípicamente ( $+/+$ ), el 50% ( $+/d$ ) y el 25% ( $d/d$ ); es decir, el 75% de ellos serán fenotípicamente sanos (de los cuales 2/3 son portadores) y el 25% serán enfermos.

En estos procesos la penetrancia suele ser completa ( $P = 100\%$ ) en los homocigotos ( $d/d$ ), con expresividad poco variable y nula ( $P = 0$ ) en los heterocigotos ( $+/d$ ). Las enfermedades recesivas acostumbran a ser más graves que las dominantes, con una eficacia biológica muy baja (no llegan a la edad reproductiva o dejan pocos descendientes). La tasa de

mutación recurrente es despreciable ( $\mu \approx 0$ ), de modo que frente a un afectado, sus padres son portadores obligados. La pérdida de alelos deletéreos de la población se compensa por otros mecanismos, como la ventaja selectiva de los heterocigotos ( $+/d$ ) (anemia de células falciformes), efectos fundadores o consanguinidad (*deriva genética*). Dichos mecanismos compensatorios pueden explicar la alta incidencia de determinados procesos recesivos en algunas poblaciones, como la fibrosis quística en la población caucásica (raza blanca) o la anemia de células falciformes (hemoglobina S) y las talasemias en regiones con malaria (véase Susceptibilidad genética, más adelante).

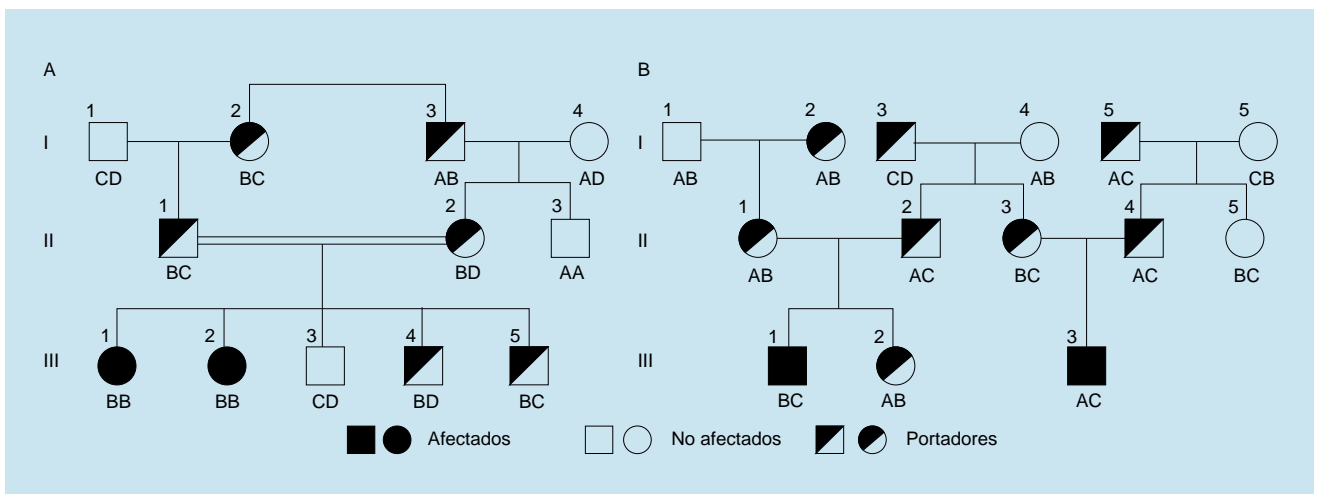
Otras características de los procesos recesivos son: a) la transmisión es de tipo *horizontal*, en la que padres normales tienen uno o más hijos enfermos; b) en el caso de que un individuo afectado tenga hijos, éstos serán normales a no ser que su pareja sea un individuo portador, y c) ambos sexos se ven igualmente afectados. La consanguinidad se encuentra presente en muchos casos de defectos recesivos, especialmente en aquellos cuya incidencia en la población general es baja. Un matrimonio consanguíneo favorece la concurrencia en un mismo individuo de dos genes recesivos (fig. 9.12).

### Herencia autosómica codominante

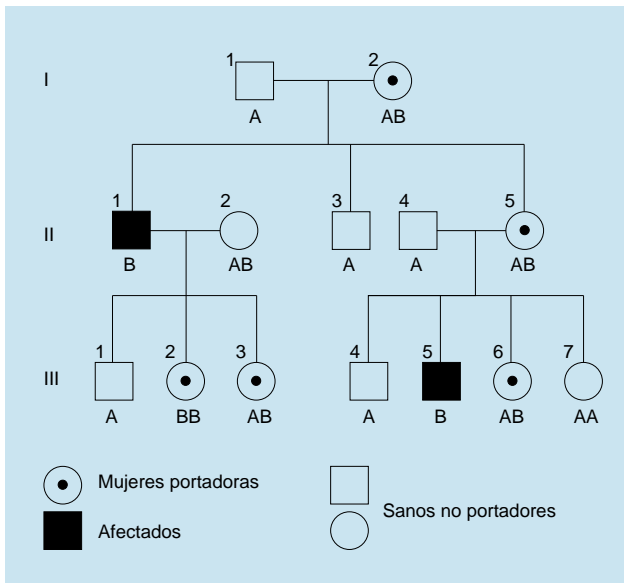
En la *herencia codominante* el carácter fenotípico producido por cada alelo tiene su expresión en el heterocigoto. En el caso de muchos grupos sanguíneos, como el clásico ABO, en el que los genotipos  $I^A/I^A$  e  $I^A/i$  ocasionan el grupo sanguíneo "A",  $I^B/I^B$  e  $I^B/i$  el "B", e  $i/i$  el "0". En todos los casos expuestos existe una dominancia con  $I^B > i$  e  $I^A > i$ . La codominancia se da en el genotipo  $I^A/I^B$ , que causa un grupo sanguíneo (fenotipo) "AB". Existe asimismo codominancia en el complejo HLA (véase Complejo mayor de histocompatibilidad y enfermedad, más adelante) y en muchas variantes bioquímicas. Los polimorfismos del DNA, que utilizamos en los estudios de segregación genéticos de las genealogías, tienen un patrón de herencia codominante.

### Herencia ligada al cromosoma X

Se han descrito más de 200 defectos recesivos ligados al cromosoma X. La enfermedad se transmite a la siguiente generación mediante una mujer portadora asintomática ( $X/X$ )



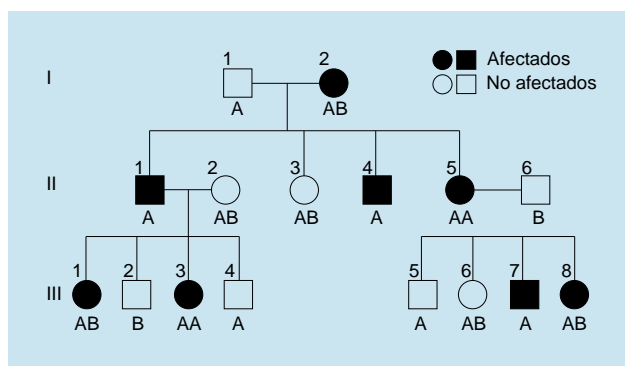
**Fig. 9.12.** A. Patrón de herencia de la fibrosis quística, enfermedad autosómica recesiva, en una familia en la que se puede advertir un matrimonio consanguíneo (II-1 y II-2). El mismo haplotipo B está asociado a la enfermedad en las dos ramas de la familia. B. Genealogía de otra familia con fibrosis quística en la que no existe consanguinidad, pero los dos hermanos portadores (II-2 y II-3) se han casado con portadores de la población general (probabilidad de 1 en 25) y han tenido hijos enfermos. Los distintos haplotipos heredados demuestran la ausencia de consanguinidad en esta familia. En ambas familias se aprecia el patrón de herencia horizontal.



**Fig. 9.13.** Árbol genealógico de una familia afectada de hemofilia A, enfermedad recesiva ligada al cromosoma X. La enfermedad se hereda asociada al alelo B de un marcador cercano al gen del factor VIII de la coagulación.

(+/*d*) (*penetrancia nula*), en la que la mitad de los hijos varones (X/Y) serán enfermos (*dl*-) (hemicigotos) y la mitad de las hijas (X/X) serán portadoras (+/*d*) (heterocigotas) sanas. En la **figura 9.13** se muestra una genealogía donde se transmite un defecto recesivo ligado al sexo. En algunas circunstancias se pueden presentar mujeres afectadas: *a*) hijas de un varón enfermo (*dl*-) y una mujer portadora sana (+/*d*); *b*) casos de cierta penetrancia (incompleta, pero no del todo nula) en las mujeres; *c*) casos de *semidominancia* (fenotipo menos severo); *d*) *inactivación estocástica* preferente del cromosoma X portador del alelo "sano" (+), en suficiente proporción de células como para manifestarse la afección, y *e*) *inactivación no estocástica* (dirigida) del citado cromosoma. Esto último suele ocurrir en translocaciones recíprocas autosoma/X, causantes de enfermedad por disrupción de un gen, en las que se inactiva siempre el cromosoma X no afectado por aquella, siendo un ejemplo algunos casos de distrofia muscular de Duchenne (DMD).

Las enfermedades de herencia recesiva ligada al sexo suelen ser de gravedad intermedia respecto a las autosómicas dominantes y recesivas. Las mutaciones *de novo* tienen cierta



**Fig. 9.14.** Patrón de herencia dominante ligado al sexo. Se observa que los hijos de un varón afectado son siempre sanos, mientras que todas las hijas presentan la enfermedad. La mitad de los hijos y las hijas de una mujer afectada padecerán la enfermedad. En esta familia el defecto se hereda ligado al alelo A de un marcador cercano al locus enfermo.

relevancia, y la fracción (*X*) de la incidencia (*I*) debida a ellas se calcula según la expresión:

$$X = \mu(1 - f) / (2\mu + v)$$

siendo  $\mu$  y  $v$  las tasas de mutación en óvulos y en espermatozoides, respectivamente. Si  $\mu = v$  y  $f = 0$  (enfermedad que impide dejar descendencia, como es el caso de la DMD),  $X = 1/3$  (véase Consejo genético y diagnóstico, más adelante).

La *herencia dominante ligada al cromosoma X* es rara. La enfermedad se transmite por mujeres afectadas (+/*D*), siendo usualmente letal en los varones, en los que suele ser abortiva. Este tipo de proceso se ilustra en la **figura 9.14**. Algunos ejemplos son la incontinencia *pigmenti*, la hipoplasia dérmica focal, el síndrome orofaciocelular y el déficit de ornitina transcarbamilasa. En la mayoría de estas enfermedades sólo están afectadas las mujeres, mientras que los varones enfermos no llegan a la edad reproductiva.

## Imprinting genómico

El término *imprinting* genómico se refiere a la diferente expresión de los genes en un individuo, dependiendo del sexo del progenitor del que proceden. En embriones de ratón únicamente se expresa el gen para el factor de crecimiento IGF-II procedente del progenitor masculino. En cambio, el gen del receptor para el IGF-II sólo se expresa si su procedencia es materna. En varias enfermedades hereditarias se cita el fenómeno del *imprinting*: las deleciones de 15q11-13 originan el síndrome de Angelman si la procedencia es materna, mientras que si es paterna el hijo padece un síndrome de Prader-Willi. Los casos esporádicos del síndrome de Beck-Wiedemann se asocian a una duplicación del cromosoma 11p15 procedente del padre, mientras que en las genealogías con varios afectados sólo las mujeres transmiten la enfermedad, no hallándose tal duplicación. Otras enfermedades son de inicio más temprano si se heredan procedentes de un varón, como la corea de Huntington y la ataxia dominante olivopontocerebelosa.

El efecto del *imprinting* puede verse reflejado también en los síndromes neoplásicos recesivos. En los tumores recesi-

**TABLA 9.3.** Efecto del origen paterno o materno en las mutaciones dominantes y en tumores recesivos

Enfermedad	Cromosoma	Comentarios
Corea de Huntington	4	Comienzo más temprano asociado a transmisión paterna
Ataxia espinocerebelosa	6	Comienzo más temprano asociado a transmisión paterna
Tumor de Wilms	11	Pérdida de alelos en tumores esporádicos
Osteosarcoma	13	Pérdida de alelos en tumores esporádicos
Síndrome de Angelman	15	Deleción de 15q11-13 de origen materno
Síndrome de Prader-Willi	15	Deleción de 15q11-13 de origen paterno
Neurofibromatosis tipo 1	17	Mayor gravedad en la transmisión materna; mutaciones espontáneas más frecuentes de origen paterno
Distrofia miotónica	19	Forma congénita de transmisión materna casi exclusivamente
Neurofibromatosis tipo 2	22	Comienzo temprano con transmisión materna

vos, ambos alelos del gen supresor tumoral se encuentran alterados, uno debido a mutación y el otro por recombinación somática o no disyunción. El retinoblastoma, el osteosarcoma y el tumor de Wilms parecen actuar mediante este mecanismo. En los casos esporádicos de estos tumores se ha observado que la pérdida cromosómica materna o paterna no se produce con igual frecuencia. En el tumor de Wilms y en el osteosarcoma se pierde con mayor frecuencia el cromosoma materno que el paterno, mientras que en el retinoblastoma no existe ninguna preferencia en la pérdida cromosómica. La retención preferencial de uno de los cromosomas podría explicarse gracias al *imprinting*, el cual conferiría a los distintos alelos paternos o maternos una susceptibilidad distinta frente a la mutación somática.

El fenómeno del *imprinting* no se comprende suficientemente, pero se supone que actuaría sobre los gametos o sobre el embrión de forma distinta en función del sexo del progenitor transmisor del gen mutado. En la corea de Huntington, la distrofia miotónica y la ataxia espinocerebelosa el mecanismo mutacional de expansión de tripletes de nucleótidos (véase más adelante) ha supuesto una mejor comprensión del mecanismo mutacional en estos procesos. Los genes que controlan el *imprinting* podrían desempeñar un papel esencial en la expresividad de los defectos genéticos, aunque de momento todavía no son conocidos (tabla 9.3).

## Herencia poligénica

El principal impacto de la genética en el campo de la medicina se ha centrado sobre todo en dos tipos de alteraciones genéticas: los defectos que se transmiten de forma mendeliana, debidos a alteraciones situadas en un único gen (enfermedades monogénicas), y las alteraciones cromosómicas. Sin embargo, los factores genéticos desempeñan un papel fundamental en la mayoría de las enfermedades comunes que afectan a la población. Estas alteraciones incluyen los defectos del nacimiento (defectos del tubo neural, enfermedad cardíaca congénita), las enfermedades comunes de la edad media de la vida (coronariopatía, diabetes, hipertensión arterial) y los principales trastornos psiquiátricos (esquizofrenia, psicosis maniaco-depresiva). En todas estas enfermedades se ha demostrado una clara predisposición familiar, aunque no se ha podido hallar un patrón claro de herencia mendeliana.

El *fenotipo* de un individuo es el resultado de la interacción de sus distintos genes entre sí y con el ambiente con el que se relaciona. Un gen determinado produce efectos (fenotipo) a distintos niveles anatomofisiológicos de un organismo, lo cual se conoce como *pleiotropía*. De forma recíproca, un fenotipo determinado suele ser debido a la interacción de varios genes. Cuando un fenotipo depende fundamentalmente de la acción de un solo gen, denominado *gen mayor*, se trata de una *herencia monogénica*, explicable con modelos mendelianos sencillos. Son caracteres fenotípicos fácilmente clasificables desde el punto de vista cualitativo o de variación discreta. El efecto del gen mayor puede estar modulado por la acción de un conjunto de *genes menores* o *modificadores*, además de por el ambiente, produciendo una distribución más continua en la variación de los fenotipos.

GALTON, a mediados del siglo XIX, coetáneo de DARWIN y MENDEL, inició una aproximación estadística en los estudios de la herencia de los *caracteres fenotípicos de variación continua* (altura, peso, conducta, inteligencia, etc.), susceptibles de medición (biometría) (caracteres cuantitativos). En su momento, se pensó que estos caracteres seguían una *herencia no mendeliana*. En la segunda década de nuestro siglo se dilucidó que dichos caracteres se heredaban según una *herencia poligénica* o *cuantitativa*. Se trata de muchos *loci*, no necesariamente ligados (segregación no independiente) y con herencia mendeliana, que contribuyen cada uno de

ellos con pequeñas acciones, de forma fundamentalmente *aditiva*, en el desarrollo de un fenotipo determinado. Cada *locus* puede presentar varios tipos de alelos de efectos asimismo aditivos. En los caracteres fenotípicos cuantitativos de variación continua, además de los factores genéticos (herencia poligénica), se invoca la gran importancia del factor ambiental en la configuración del fenotipo final, hablándose de una *herencia multifactorial*. De este modo, la variación en los fenotipos (*F*) se debe a la variación en los genotipos (*G*) sumado a la variación producida por el ambiente (*A*). En términos de variancia ( $\sigma^2$ ):

$$\sigma^2_F = \sigma^2_G + \sigma^2_A$$

En muchas enfermedades genéticas se sospecha este tipo de herencia multifactorial (defecto del tubo neural, hendidura palatina, espina bífida, estenosis pilórica congénita, malformaciones cardíacas, diversas malformaciones congénitas, etc.). El 2% de los recién nacidos padecen malformaciones de herencia multifactorial, siendo cada día más numerosos los procesos en los que se advierte una base genética (hipertensión esencial, arteriosclerosis, enfermedad coronaria, diabetes, reumatismos, procesos autoinmunes, alergias, esquizofrenia, enfermedad maniaco-depresiva, esclerosis múltiple, etc.).

La "porción" heredable de un carácter cuantitativo continuo se calcula con la heredabilidad ( $h^2$ ), relacionando la variación del carácter debida al genotipo con la total:

$$h^2 = \sigma^2_G / \sigma^2_F$$

Asimismo, la sospecha de estar frente a una enfermedad de sustrato genético surge al comprobar genealogías en las que la aparición de nuevos casos (recurrencia) es superior a la incidencia en la población general. En otros procesos se advierte un componente hereditario aun cuando no se dispone de caracteres mesurables, tratándose el fenotipo más bien de la presencia o la ausencia de una alteración determinada que de una gradación en el fenotipo (pudiendo subyacer algún carácter cuantitativo no identificado).

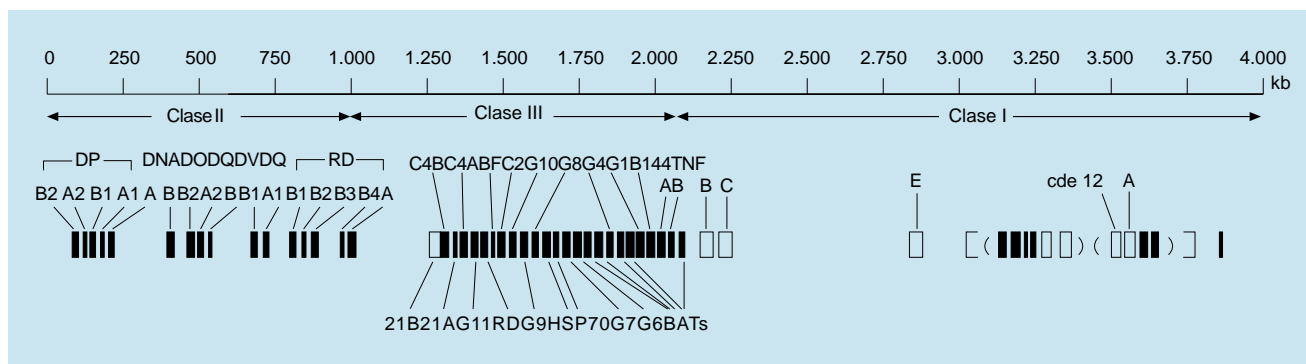
## Susceptibilidad genética

Algunas características genéticas predisponen o previenen la afectación frente a determinadas enfermedades. Los individuos heterocigotos para la hemoglobina S, el déficit para la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa y algunas betatalasemias previenen la infección palúdica, al crear en el hematíe un ambiente bioquímico adverso al desarrollo del esporozoo. Las asociaciones del sistema HLA (antígenos leucocitarios humanos) con determinados procesos patológicos son todavía de mayor interés.

### Complejo mayor de histocompatibilidad y enfermedad

El sistema HLA está constituido por un conjunto de proteínas relacionadas con el sistema inmunitario, correspondiendo en su mayor parte (no exclusivamente) a antígenos de membrana de leucocitos. Los genes que codifican dichas proteínas están situados en una región, de unas 4 megabases (Mb), del brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3) (fig. 9.15), agrupados en tres subregiones, funcionalmente similares. La subregión más telomérica (distal) codifica para las *proteínas del tipo I*, que corresponden a un componente (cadena pesada de 44 kD, hipervariable) de antígenos de membrana ampliamente distribuidos en la superficie de células de muchos tejidos, reconocibles por los linfocitos T citotóxicos. En la constitución definitiva de estos antígenos se forma un dímero no covalente con una  $\beta_2$ -microglobulina (cadena ligera de 12 kD, constante) codificada por un gen localizado en el cromosoma 15. Los genes responsables se agrupan en varios *loci* (más de 20), tres de los cuales presentan *sistemas polialé-*





**Fig. 9.15.** Mapa de los genes del sistema HLA localizados en la región 6p21.3. Los números de la línea superior indican kilobases (kb).

licos, reconocibles inmunológicamente: A, B y C. El grupo incluye asimismo el gen de la hemocromatosis idiopática. La subregión centromérica (proximal) codifica para las *proteínas del tipo II*: antígenos de membrana de linfocitos B, macrófagos y células epiteliales. Entre sus genes destacan los *loci* polialélicos DP, DQ y DR, que codifican, cada uno de ellos, para una cadena polipeptídica a (34 kD) y una b (29 kD), identificables inmunológicamente. La región central codifica para las *proteínas del tipo III*, que corresponden a ciertos factores del complemento. Además contiene el gen de la 21-OH-hidroxilasa de esteroides.

Se han descrito más de 4.000 situaciones en las que, en afectados de diversos procesos morbosos, la frecuencia de determinados antígenos HLA (alelos) es significativamente distinta a la frecuencia correspondiente a individuos de la población general. La asociación se explica por una de las dos siguientes hipótesis: a) un efecto directo inmunológico debido a la peculiar estructura del antígeno o b) un desequilibrio de ligamiento: la proximidad de los *loci* HLA con los *loci* responsables de algunas enfermedades posibilita la asociación preferente de determinados alelos HLA con alelos deletéreos. Este último mecanismo explicaría la asociación del alelo A3 con la hemocromatosis, cuyo gen está ligado al complejo HLA tipo I y la del alelo Bw47 con la deficiencia de 21-OH-hidroxilasa, ligada al complejo HLA tipo III. La asociación a otras entidades puede corresponder a cualquiera de las dos hipótesis; así, la espondilitis anquilosante, la artritis reumatoide, la diabetes juvenil insulino dependiente y otras con un sustrato fisiopatológico autoinmune pueden estar causadas por algún déficit inmunológico debido al propio antígeno HLA, o bien puede tratarse de un desequilibrio de ligamiento subyacente con algún *locus* próximo al complejo de genes HLA, cuya alteración en su producto ocasiona el proceso morbosos. En general, la incidencia de las enfermedades mencionadas es baja y no se detectan asociaciones de intensidad suficiente como para aumentar sensiblemente el riesgo de padecerlas; sin embargo, el hecho de no detectar un alelo HLA puede ser útil para excluir un trastorno determinado: la ausencia del alelo B27 en un individuo hace muy improbable que éste presente una espondilitis anquilosante (unas 100 veces menos probable que cuando se detecta). La asociación entre el alelo DR2 y la narcolepsia es tal que todos los individuos con la enfermedad lo presentan, mientras que sólo se detecta en el 10-34% de la población general. La ausencia de dicho alelo en un individuo excluye la enfermedad en éste; de todos modos, la presencia del alelo sigue haciendo a la enfermedad harto improbable: probabilidades del 0,5%, debido a su baja incidencia (0,05 - 0,67%).

En la **tabla 9.4** se muestran algunas de las asociaciones entre enfermedades y alelos de los *loci* HLA y la variación en el riesgo de padecerlas (*riesgo relativo*) que implica su presencia:

$$\text{riesgo relativo} = \text{riesgo con el alelo} / \text{riesgo sin el alelo}$$

**TABLA 9.4.** Principales enfermedades para las que existe una asociación a alelos del sistema HLA

Enfermedad	HLA	Riesgo relativo
Hemocromatosis idiopática	A3; B14	8
Deficiencia de 21-hidroxilasa	Bw47	15
Espondilitis anquilosante	B27	90-350
Síndrome de Reiter	B27	37
Artritis reumatoide	DR4; DRw4	4-6
Artritis reumatoide juvenil	B27	3,9
Lupus eritematoso disseminado	B8	3
Psoriasis	B17	5,3
Enfermedad celíaca	B8	7,6
Esclerosis múltiple	DR2	2,7
Miastenia grave	B8	3,3
Diabetes mellitus insulino dependiente	DR4	3,6
	DR3	3,3
Pénfigo vulgar	B7; DR2	0,5-0,25
	DRw6	2,5
	DQB1.3	100
Narcolepsia	DR2	∞

La *probabilidad (P)* de presentar determinada enfermedad debido a la identificación de cierto alelo (riesgo) se calcula según un *cálculo bayesiano* (véase el apartado sobre riesgo de recurrencia en Consejo genético y diagnóstico, más adelante). Si  $f_d$  es la frecuencia de un alelo HLA en los individuos con determinada enfermedad y  $f_g$  es su frecuencia en la población general, obtendremos que:

$$R = f_d / f_g$$

Siendo *I* la incidencia de la enfermedad, dicha probabilidad será:

$$P = R / [R + (1/I) - 1]$$

### Enfermedad cardíaca coronaria

La enfermedad coronaria presenta su mayor incidencia en la población occidental, siendo la principal causa de muerte de los varones entre 45 y 75 años de edad en EE.UU. y en Europa occidental. La cardiopatía isquémica es consecuencia de aterosclerosis en las arterias coronarias. Entre los varios factores de riesgo descritos para la aterosclerosis coronaria, los principales son: edad, sexo, hipertensión, hipercolesterolemia (considerada globalmente), concentraciones bajas de lipoproteínas de alta densidad (HDL), concentraciones altas de lipoproteínas de baja densidad (LDL), diabetes y tabaquismo. Otros factores de riesgo implicados son: hipertrigliceridemia, concentraciones elevadas de apolipoproteína A<sub>1</sub>, concentraciones elevadas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), sedentarismo, obesidad, estrés, etc. La recurrencia de la enfermedad es unas cinco veces más alta en familias con miembros afectados por ella que en familias

control de la población general. Esta mayor incidencia es más acusada si se trata de enfermedad cardíaca coronaria prematura o si existen mujeres entre los familiares afectados. La historia familiar de enfermedad cardíaca coronaria prematura es el factor de riesgo más relevante y tiene mayor valor que los factores restantes.

La hipercolesterolemia de causa multifactorial, en la que se encuentran elevadas las LDL, con un alto índice aterogénico (relación entre el colesterol total y el transportado por las HDL), parece tener un papel relevante en la aterosclerosis, afectando alrededor del 5% de la población. La hipercolesterolemia familiar (hiperlipemia tipo IIA) es un defecto autosómico dominante con una frecuencia de heterocigotos de 1/500 en EE.UU. Los individuos heterocigotos tienen elevadas las concentraciones de colesterol y de LDL, por encima de los de la población general. El 50% de los varones afectados presentan algunas manifestaciones de enfermedad cardíaca coronaria hacia la edad de 50 años. La aparición de xantomas en los tendones y del arco senil precoz en los heterocigotos es muy frecuente. En las mujeres la sintomatología aparece unos 15 años más tarde. El estado de homocigoto es extremadamente raro, y en estos casos la enfermedad coronaria ocurre antes de los 20 o 30 años de edad. Se calcula que uno de cada 25 individuos con niveles de colesterol situados por encima de los valores normales es portador del gen de la hipercolesterolemia familiar, y que alrededor del 5% de los pacientes que han padecido un infarto de miocardio antes de los 60 años, son heterocigotos para el gen de la citada entidad.

Recientemente se ha demostrado que alrededor del 10% de los pacientes con hipercolesterolemia presentan alteraciones moleculares en el gen del receptor de las LDL, tratándose de deleciones o duplicaciones (véase Patología molecular hereditaria y Anomalías cromosómicas). La hiperlipemia familiar combinada, en la que se encuentran elevados los triglicéridos y el colesterol (tipo IIB), el colesterol solo (tipo II) o los triglicéridos solos (tipo IV), cursa con valores elevados de apolipoproteína B y afecta al 1% de la población, segregándose de forma autosómica dominante con una penetrancia que es máxima hacia los 30 años de edad. La hipertrigliceridemia familiar se transmite de forma autosómica dominante, afecta al 1% de la población y el defecto básico de la enfermedad no se conoce todavía. La hiperlipemia tipo III o disbetalipemia afecta a uno de cada 10.000 individuos, y se han descrito mutaciones en el gen de la apolipoproteína E.

### Enfermedades psiquiátricas

Se sospecha que existe un marcado componente genético en muchas enfermedades psiquiátricas. Existen familias con miembros afectados de psicosis maniaco-depresivas o de esquizofrenia en las que estas enfermedades se presentan con un claro componente hereditario. Los estudios de ligamiento genético realizados hasta la actualidad en estos procesos han proporcionado resultados contradictorios. Ello se debe probablemente a que existen varios *loci* y en las distintas familias la afección correspondiente se debe a genes localizados en cromosomas distintos. Los estudios de asociación alélica empleando marcadores altamente informativos pueden facilitar la identificación de cada uno de los genes implicados en estos procesos.

## Heterogeneidad

### Heterogeneidad genética

Existe *heterogeneidad genética* cuando un mismo tipo de enfermedad hereditaria se debe a alteraciones de diversos

genes, localizados en distintas partes del genoma, que *respectiva y aisladamente* son capaces de reproducirla. Un gen determinado será el responsable del trastorno hereditario en una proporción determinada de genealogías, no necesariamente relacionadas. Algunas posibles explicaciones de la heterogeneidad son las mutaciones en distintos genes que codifican enzimas de una vía metabólica común (*epístasis*) o en la alteración de subunidades, dependientes de distintos genes, de un complejo proteico determinado.

La metaemoglobinemia hereditaria puede ser debida a alteraciones en las cadenas de globina  $\alpha$  (cromosoma 16),  $\beta$  o  $\gamma$  (cromosoma 11) (autosómica dominante) o en la NADH-metaemoglobina-reductasa (cromosoma 22) (autosómica recesiva). En la ataxia cerebrosa autosómica dominante hay familias en las que el gen responsable está ligado a *loci* marcadores del cromosoma 6 (segregación no independiente; véase el apartado Ligamiento genético). El gen situado en el cromosoma 6 ha sido aislado recientemente; sin embargo, en otras familias el gen responsable de la ataxia cerebrosa de herencia dominante se encuentra ligado a *loci* marcadores del cromosoma 12, y en otras se ha observado ligamiento en el cromosoma 14, sospechándose más de 10 genes implicados en la enfermedad. En todos los casos, el ligamiento con cada *locus* enfermo se acompaña de la segregación independiente con el resto. La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) tipo I (forma más común, hipertrófica y desmielinizante) presenta dos grupos de ligamiento con herencia autosómica dominante. En la forma *1a* el ligamiento genético señala el cromosoma 17 (17p11.2), en el que recientemente se ha aislado el gen responsable de la enfermedad. En la forma *1b* está localizado en el cromosoma 1 (1q21.1-23.1), y depende de mutaciones en el gen *Po*. Existen familias en las que se diagnostica otra forma menos frecuente y más grave de CMT tipo I, con herencia autosómica recesiva, así como una forma ligada al cromosoma X. La enfermedad de Werdnig-Hoffmann, o atrofia muscular espinal infantilojuvenil (AME p SMA) *aguda*, es una enfermedad autosómica recesiva, dependiente de un gen en el cromosoma 5 (5q11.2-13.3) en el 95% de las familias. El 40% de las familias con AME de forma *crónica* dependen del mismo gen (hipótesis de *alélismo*) en el cromosoma 5, tratándose el resto de otro u otros genes responsables con herencia autosómica dominante.

La heterogeneidad se ha descrito en muchas otras enfermedades: esclerosis tuberosa, ataxia-telangiectasia, sordera congénita, retinitis pigmentaria, etc., debiéndose tener muy en cuenta esta situación en los cálculos de las probabilidades de padecerlas o/y transmitirlos (véase Consejo genético y diagnóstico).

### Heterogeneidad molecular

La heterogeneidad molecular se refiere a las distintas mutaciones de un *mismo gen* (pudiéndose considerar alelos), que a menudo causan enfermedades distintas. La DMD está provocada por distintas mutaciones en un gen situado en Xp21.2. Otro grupo de mutaciones en ese mismo gen provoca una forma menos grave, la distrofia muscular de Becker. Distintas mutaciones en el gen de las cadenas de globina  $\beta$  originan diferentes formas de betatalasemia o anemia de células falciformes. Mutaciones en los genes del colágeno COL1A1 y COL1A2 son responsables de enfermedades muy distintas, como la osteogénesis imperfecta o la enfermedad de Ehlers-Danlos, según el tipo de defecto molecular que presenten.

### Penetrancia e interacción genética

La *penetrancia* es la probabilidad de que se presente un fenotipo determinado, dado que se posee un genotipo determinado. Un individuo que ha heredado un alelo deletéreo

(D) de una enfermedad autosómica dominante, poseerá un genotipo (+/D) para el *locus* donde asienta el gen responsable de la enfermedad [(+) corresponde al alelo no mutado]; la penetrancia del genotipo (+/D) corresponde a la probabilidad de que dicho individuo desarrolle la enfermedad. Si la citada probabilidad es 1 (el 100% de los casos), se habla de *penetrancia completa*; si es menor que 1, de *penetrancia incompleta* [sólo una proporción de individuos (+/D) enferman]. Usualmente las enfermedades autosómicas recesivas tienen penetrancia completa, y las dominantes, penetrancia incompleta. Por lo general, la penetrancia varía según la edad de los individuos, siendo muchas veces completa en términos globales, considerando toda la vida de un individuo, pero incompleta dependiendo de cada edad. Un individuo de 10 años con un genotipo (+/D) tiene menos del 5% de probabilidad de manifestar una ataxia cerebelosa autosómica dominante, en comparación con uno de 70 años, con una probabilidad de prácticamente el 100%.

Las *fenocopias* son los fenotipos que emulan a uno que depende de un genotipo dado. Corresponden a caracteres adquiridos, no hereditarios, o de naturaleza multifactorial. Pueden tratarse en términos de penetrancia: un genotipo (+/+) tendrá una probabilidad definida (pequeña) de producir el mismo fenotipo enfermo (fenocopia) que el genotipo (+/D); la mayoría de los casos de ataxia cerebelosa son casos aislados, no hereditarios, con el mismo fenotipo que los de herencia autosómica dominante. Un ejemplo típico de fenocopia es el enfisema asociado al tabaquismo frente al enfisema que se desarrolla en los pacientes homocigotos para mutaciones en el gen codificante para la  $\alpha_1$ -antitripsina.

La *expresividad* se refiere al grado de manifestación de un fenotipo determinado. Si una enfermedad presenta varios grados de manifestación (heterogeneidad clínica) se dice que es de expresividad variable. La penetrancia y la expresividad responden a la *interacción de genes menores* (véase Herencia poligénica, antes) de pequeños efectos fenotípicos muy influidos por el ambiente, que modulan el efecto del gen mayor, principal responsable del proceso morboso.

## Patología mitocondrial: herencia materna

Se conoce como herencia materna la que depende de genes localizados en las mitocondrias. Las mitocondrias del cigoto proceden del óvulo, por lo que sólo las mujeres transmiten las lesiones en el DNA mitocondrial, pudiendo padecer las enfermedades derivadas de ellas ambos sexos por igual.

El DNA mitocondrial tiene 16.569 nucleótidos en una molécula circular. Codifica para unos 13 polipéptidos de la vía generadora de ATP de la mitocondria para la fosforilación oxidativa, funcionalmente implicados en la cadena de transporte electrónico de la respiración aerobia, junto con RNA ribosómico (rRNA) 12S y 16S y 22 RNA de transferencia (tRNA). Cada célula tiene centenares de mitocondrias y cada mitocondria posee de 8 a 10 cadenas dúplex de DNA mitocondrial, calculándose unas 5.000 copias de DNA mitocondrial

por genoma diploide. Las dos cadenas de cada molécula son codificantes, sin intrones en sus genes, pudiéndose distinguir entre una cadena "pesada" y una "ligera", según su composición nucleotídica, que se transcriben en un gran RNA policistrónico a la manera de los organismos procariotas.

En las enfermedades genéticas mitocondriales, las células de los tejidos afectados no presentan la mutación en el DNA de todas sus mitocondrias, sino en un grupo de ellas, fenómeno conocido como *heteroplasmia*. Las mutaciones del DNA mitocondrial ocasionan anomalías cuando se implica una proporción suficiente o umbral (cifrada en el 10%) de mitocondrias. Varios tejidos requieren la energía de las mitocondrias a distintos niveles, especialmente el cerebro, el corazón, el músculo, el riñón y las glándulas exocrinas, en los que el metabolismo aerobio tiene especial relevancia. A medida que la proporción de DNA mitocondrial mutado aumenta entre los familiares de una madre portadora de una mutación determinada, se presentará sintomatología clínica, que se traducirá en cuadros patológicos concretos, dependiendo del gen o los genes alterados.

El DNA mitocondrial tiene un elevado índice de mutación. Las mutaciones que se producen en la célula germinal darán como resultado una enfermedad familiar, mientras que aquellas que sucedan durante el desarrollo provocarán una enfermedad somática esporádica a la vez que el deterioro relacionado con la edad en la fosforilación oxidativa. Cuando las células se dividen mitóticamente, las mitocondrias se reparten al azar entre las dos células hijas, provocando que la proporción de ellas mutadas varíe de una célula a otra. Ello explica la expresividad tan variable en su intensidad y extensión histológica de este grupo de procesos, entre los que se hallan la atrofia óptica hereditaria de Leber (LHON), la epilepsia mioclónica y la enfermedad de fibras *ragged red* (MERRF), la miopatía mitocondrial (MM), episodios de accidente vascular cerebral, la acidosis láctica y la encefalomiopatía mitocondrial (MELAS), y el síndrome de Kearns-Sayre. Además del efecto de las lesiones en el tejido por las mutaciones específicas del DNA mitocondrial, existen genes nucleares, codificantes de funciones mitocondriales, que modulan el efecto de las mutaciones mitocondriales hereditarias, implicando manifestaciones clínicas distintas. Las lesiones moleculares del DNA mitocondrial se están estudiando con gran intensidad durante los últimos años. Estos estudios permitirán resolver las grandes incógnitas sobre el papel y el efecto de estas mutaciones en los procesos patológicos.

### Bibliografía especial

- CONNOR JM, FERGUSON-SMITH MA. Essential medical genetics. 4.ª ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1993.
- DAVIES KE, READ AP. Molecular basis of inherited diseases. Oxford, Washington, IRL Press, 1988.
- LANDER EC. Mapping complex genetic traits in humans. En: DAVIES KE, ed. Genome analysis. A practical approach. Oxford, Washington, IRL Press, 1988; 171-189.
- OTT J. A short guide to linkage analysis. En: DAVIES KE, ed. Human genetic diseases. A practical approach. Oxford, Washington, IRL Press, 1986; 19-32.
- VOGEL F, MOTULSKY AG. Human genetics. Problems and approaches. 2.ª ed. Berlín, Springer, 1986.

# Principios del análisis genético

X. Estivill Pallejà y N. Morral Còdol

Las nuevas tecnologías en biología y medicina suponen, a menudo, un cambio rápido y sustancial sobre la forma de abordar los problemas científicos que se plantean ante nosotros. La tecnología del DNA recombinante ha tenido un enorme impacto en la investigación y el diagnóstico de las bases moleculares de las enfermedades. Los métodos de laboratorio que se emplean para el análisis molecular son laboriosos y requieren una notable especialización. En este capítulo se revisan las principales tecnologías empleadas en genética molecular, con especial hincapié en sus aplicaciones médicas.

## Análisis del DNA genómico

### Extracción de ácidos nucleicos

El DNA puede obtenerse a partir de cualquier célula nucleada de nuestro organismo. Pocos microgramos ( $\mu\text{g}$ ) de DNA son suficientes para realizar un análisis genotípico. Una célula contiene aproximadamente 5 picogramos ( $\text{pg}$ ) de DNA. Los estudios de la expresión de la información genética requieren del análisis del RNA, el cual debe proceder de tejidos en los que el gen que se estudia se encuentre expresado. Los métodos de obtención de los ácidos nucleicos son muy sencillos, aunque laboriosos. La principal preocupación en la obtención del DNA o el RNA es evitar la degradación producida por las enzimas liberadas por las células una vez lisadas.

La extracción de DNA a partir de leucocitos es la más utilizada, dado que es el tejido de más fácil acceso. Unos 20 ml de sangre periférica, recogidos en presencia de un anticoagulante como el EDTA, proporcionan entre 250 y 500  $\mu\text{g}$  de DNA, cantidad suficiente para la mayoría de los estudios. Las muestras de sangre pueden conservarse a temperatura ambiente hasta un máximo de 48 h después de la extracción, debiendo ser procesadas posteriormente o congeladas hasta que se proceda a la extracción del DNA. Para la extracción del DNA deben lisarse previamente los hematíes mediante una solución hipotónica, sometiéndolo a los leucocitos a un tratamiento con un detergente (SDS) y una enzima que degrada las proteínas (proteínasa K). El DNA liberado del núcleo celular se extrae con fenol y cloroformo, los cuales retienen los restos proteicos, dejando indemne el DNA; éste se precipita posteriormente mediante la acción del etanol absoluto, pudiéndose visualizar los filamentos del DNA. El DNA se resuspende posteriormente en una solución que contiene Tris y EDTA, cuya misión es prevenir las roturas en la molécula y asegurar su conservación a 4 °C durante años.

En determinados casos se requiere el análisis del DNA a partir de moléculas más grandes, como, por ejemplo, en la construcción de mapas moleculares de fragmentos grandes del genoma. Ello se consigue con la inclusión de las células en agarosa, de forma que, al quedar el DNA inmovilizado, se previene su rotura.

La extracción del DNA a partir de tejido sólido, como son los tumores, requiere su trituración antes de la extracción propiamente dicha. Es importante que el tratamiento se haga a -80 °C, para evitar la degradación del DNA y, sobre todo, del RNA, que es mucho más frágil. Es por ello importante que el clínico se ponga en contacto con el laboratorio de genética molecular para conseguir las mejores condiciones y

asegurar que el estudio podrá realizarse de forma conveniente. Debido a la laboriosidad de la extracción del DNA, existen hoy en día aparatos que realizan automáticamente los distintos pasos y que permiten procesar de forma simultánea varias muestras.

### Enzimas de restricción

Las *enzimas de restricción* cortan el DNA de doble hebra en puntos específicos de la cadena de nucleótidos. Las enzimas de restricción se encuentran presentes en las bacterias, en las que constituyen un mecanismo de defensa frente a los bacteriófagos. Las secuencias que reconocen las enzimas de restricción son palindrómicas, es decir, que, al ser leída, la secuencia es idéntica en ambos sentidos de las dos hebras del DNA. Existen enzimas de restricción que reconocen la misma secuencia y que se denominan *isoesquizómeros*. Algunas enzimas cortan dejando un extremo 5' o 3' libre, y otras producen un corte limpio en la molécula de DNA. Las enzimas de restricción se utilizan para fragmentar el DNA de forma específica en la secuencia de bases reconocida por la enzima, permitiendo realizar estudios genotípicos y manipular el DNA para la clonación de sus fragmentos de interés (fig. 9.16).

### Separación del DNA

El DNA puede separarse según el tamaño de los fragmentos que se obtienen tras la digestión con enzimas de restricción. Esta separación se realiza sometiéndolo al DNA a una *electroforesis* en un gel de agarosa o poliacrilamida, que permite la migración de los fragmentos de DNA en función del tamaño y de la carga eléctrica. Los geles de agarosa resuelven fragmentos de entre 30 kilobases (kb) y unos 100 pares de bases (pb), mientras que los geles de poliacrilamida ofrecen separaciones de fragmentos menores, entre 1.500 y 1 pb, según sean las concentraciones empleadas.

Un tipo de electroforesis particular es la electroforesis en geles de campos pulsantes (PFGE, del inglés, *pulsed field gel electrophoresis*), que permite la separación de fragmentos de DNA de entre 50 y 10.000 kb. El DNA utilizado en este tipo

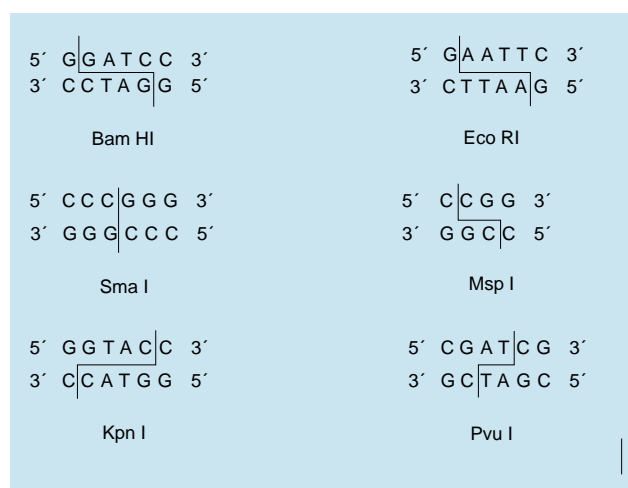


Fig. 9.16. Ejemplos de enzimas de restricción y sus lugares de reconocimiento.

de electroforesis debe haber sido incluido en agarosa. La base de la migración del DNA consiste en que las moléculas de DNA quedan atrapadas en la red que forma el gel de agarosa, y para poder avanzar su orientación debe cambiar cada vez que se cambia la dirección del campo eléctrico. Cuanto mayor es el peso molecular del fragmento, más tarda en orientarse, y menor es su migración a través del gel.

Los fragmentos de DNA obtenidos con la electroforesis del DNA se visualizan mediante la tinción de bromuro de etidio; sin embargo, en el caso del DNA genómico, existen miles de fragmentos de cada tamaño, con lo que la información que puede obtenerse con este procedimiento es de poco valor, siendo necesario complementar el análisis con otra metodología.

### Southern blotting

El método de *Southern*, descrito en 1975, ha representado un importante avance en los estudios moleculares, al permitir visualizar cualquier fragmento de DNA mediante el empleo de una sonda o marcador conocido. Se basa en la transferencia de los fragmentos de DNA obtenidos al digerir con enzimas de restricción y fraccionados mediante un gel de agarosa, a un soporte sólido, el cual puede hibridarse posteriormente con una sonda marcada. El gel se trata con el fin de desnaturalizar las hebras, para que éstas puedan unirse posteriormente a una sonda de interés. La transferencia del DNA al filtro de nilón o nitrocelulosa se realiza por capilaridad durante aproximadamente 24 h. Transcurrido este tiempo, los fragmentos se unen covalentemente al filtro mediante exposición a rayos ultravioleta (UV) o bien a 80 °C. El filtro se hibrida con una sonda marcada radiactivamente. Este proceso se realiza a una temperatura elevada para aumentar la especificidad de los híbridos que se producen entre el DNA presente en el filtro y la sonda marcada que empleamos. Pos-

teriormente el filtro se lava con soluciones de mayor a menor salinidad para eliminar la sonda que no ha hibridado con los fragmentos de interés (fig. 9.17). La exposición del filtro a una película de radiografía permite visualizar en la *autorradiografía* unas señales o bandas, que se corresponden con los tamaños de los fragmentos de DNA estudiados.

### Sondas moleculares

El hecho de que las hebras del DNA puedan dissociarse y reasociarse *in vitro* permite la utilización de fragmentos específicos de DNA como sondas o marcadores para complementar la secuencia de DNA que se quiere estudiar.

### Sondas génicas

Las *sondas génicas* pueden ser de tres tipos: genómicas, de DNA complementario (cDNA) y de RNA. Las *sondas genómicas* consisten en fragmentos del DNA del genoma, los cuales pueden corresponder a un gen o a una secuencia anónima no codificante. Las *sondas de cDNA* se obtienen a partir de la copia de un mRNA y, por tanto, corresponden a secuencias codificantes de un gen. Las *sondas RNA* son copias del RNA y se obtienen *in vitro*, mediante la síntesis de una cadena complementaria utilizando una RNA-polimerasa.

Las sondas génicas se introducen en un vector determinado para facilitar su manipulación en el laboratorio. Existen distintos vectores, según el tipo de estudios que quieran realizarse (véase Clonación molecular).

### Oligonucleótidos sintéticos

La molécula del DNA puede obtenerse de forma sintética. El proceso de síntesis se realiza en la actualidad de forma automática. El DNA que se sintetiza (*oligonucleótidos*) es de ca-

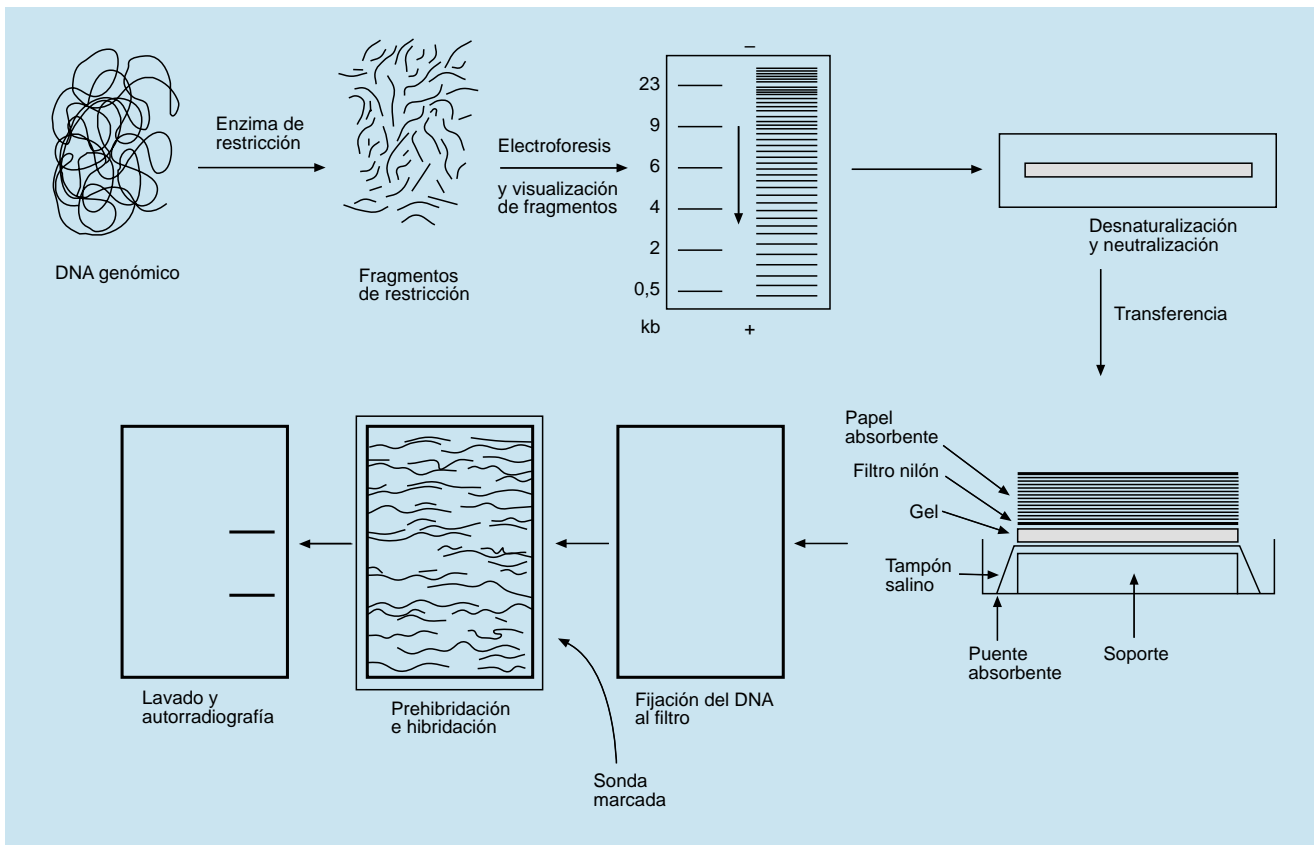


Fig. 9.17. Representación esquemática de los distintos pasos en el método de Southern blotting.



dena sencilla. Los oligonucleótidos pueden ser empleados como sondas para detectar los cambios puntuales en la secuencia del DNA, para experimentos de secuenciación o de PCR (*primer*) o bien para analizar mutaciones.

## Marcado de sondas

Las sondas pueden someterse al *marcado* mediante la utilización de isótopos radiactivos, generalmente el ( $\alpha^{32}\text{P}$ )dCTP o el ( $\alpha^{35}\text{S}$ )dCTP. Estos compuestos tienen una vida media corta (14,3 y 87,2 días, respectivamente) y, por tanto, las sondas pueden utilizarse durante poco tiempo. Para el manejo de isótopos es necesario el uso de mamparas de protección y de contenedores especiales. En la actualidad se continúa utilizando la radiactividad, principalmente porque ofrece una sensibilidad muy elevada, aunque ya han aparecido métodos de marcado alternativos en los que se utilizan elementos no radiactivos. Los más aceptados son la fluorescencia, la quimioluminiscencia y la colorimetría. Se han desarrollado muchos sistemas, pero el más ampliamente utilizado es el marcado de sondas con un nucleótido al que se ha incorporado un hapteno (biotina o digoxigenina). Después de la hibridación de la sonda, el hapteno es reconocido por una proteína (avidina, estreptavidina, antidigoxigenina) a la que se ha incorporado un compuesto que determina el sistema de detección (p. ej., la fluoresceína emite fluorescencia, mientras que la fosfatasa alcalina permite la detección por quimioluminiscencia).

Los métodos más comúnmente utilizados para marcar sondas genómicas son la *nick-translation*, en la que se utiliza la enzima *DNA-polimerasa I* de *Escherichia coli*, y el *oligolabeling*, en el que se emplea el fragmento largo de la *DNA-polimerasa I* (*Klenow*). En ambos casos se utilizan nucleótidos no marcados, y uno o dos marcados o no marcados radiactivamente. El marcado del extremo 5' de oligonucleótidos también es muy utilizado y se lleva a cabo con ( $\gamma^{32}\text{P}$ )ATP, y la enzima *T4 polinucleótido-cinasa*.

## Análisis de la expresión génica

Una vez conocidas las particularidades de un gen en cuanto a la secuencia de nucleótidos, es preciso analizar su unidad transcripcional, la cual informará sobre la expresión del gen y sobre su organización. Existen varios métodos que permiten analizar la expresión génica, entre los cuales debemos destacar el *Northern blotting* y los análisis cuantitativos y de transcripción.

### *Northern blotting*

El mRNA puede estudiarse mediante la electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes. La transferencia del RNA a un filtro de nilón se realiza del mismo modo que en el método de *Southern*, aunque en este caso no es necesario realizar el tratamiento con hidróxido sódico, pues el RNA es ya de cadena simple. El RNA transferido al filtro de nilón se hibrida del mismo modo que el DNA. Este método, denominando *Northern blotting*, permite confirmar la presencia de un RNA determinado en un tejido, conocer el tamaño del transcrito, apreciar el nivel de expresión de un gen, a la vez que permite observar fragmentos de RNA inmaduros. En ciertas ocasiones es posible observar la presencia de varios mRNA para un mismo gen, los cuales son debidos a lugares de *spllicing* alternativos o a la existencia de lugares de poliadenilación distintos, al empleo de varios promotores u a otros mecanismos.

## Análisis cuantitativos y transcripción

Mediante el *dot-blot* es posible cuantificar un RNA determinado. El RNA procedente de distintos tejidos se deposita en la superficie de un filtro y, una vez fijado a él, se hibrida con la sonda que se desea analizar. La intensidad de las señales frente al RNA conocido determina el nivel de expresión del gen en estudio. Este método permite tanto la cuantificación del RNA en distintos tejidos, como en diferentes etapas del desarrollo y la diferenciación celulares.

Existe la posibilidad de analizar *in vitro* la actividad de la transcripción. Ello se realiza utilizando los núcleos de las células en presencia de ribonucleótidos marcados. Sólo las cadenas que ya han iniciado la transcripción *in vivo* la continuarán *in vitro*. El RNA marcado se hibrida con un filtro que contiene gel en estudio, con lo que sólo los fragmentos del gen que se transcriben podrán ser visualizados en la autorradiografía.

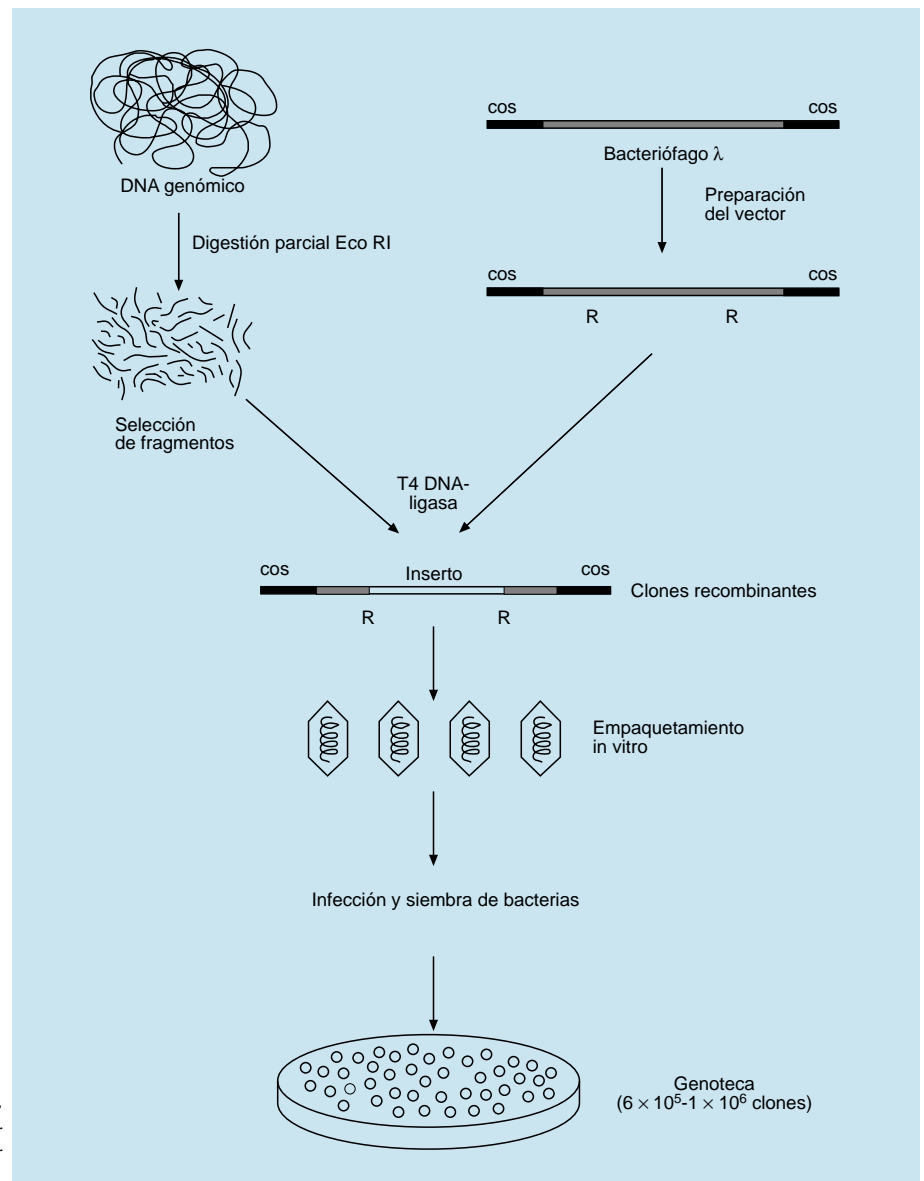
## Clonación y secuenciación

### Clonación molecular

La *clonación molecular* consiste en la obtención de fragmentos de DNA independientes en cantidad suficiente que permita su estudio. La clonación se puede realizar introduciendo los fragmentos del DNA en el seno de un vector [plásmido, cósmido, bacteriófago o *yeast artificial chromosome* (YAC)] y amplificándolos posteriormente en el interior de *E. coli* o de una levadura. Otro método de clonación molecular, desarrollado recientemente, se basa en la utilización de la PCR.

El DNA que se desea clonar puede proceder de cualquier célula y debe obtenerse en condiciones de pureza y cantidad suficientes. El DNA se digiere con las enzimas de restricción apropiadas, las cuales permitirán introducir los fragmentos obtenidos en un vector. El vector escogido para la clonación de los fragmentos de DNA depende del tamaño de éstos. Los bacteriófagos pueden incorporar entre pocas bases y 20 kb de DNA exógeno, mientras que los cósmidos permiten la clonación de fragmentos de entre 35 y 45 kb. Actualmente el uso de vectores de levaduras (YAC) permite la clonación de fragmentos de DNA de hasta 10.000 kb, facilitando el mapeo de genomas complejos y la caracterización de genes. Los YAC han sido construidos a partir de secuencias de DNA de levadura imprescindibles para el mantenimiento del cromosoma en la célula. Las levaduras son organismos eucariotas y, por tanto, su sistema de expresión es mucho más parecido al humano que al bacteriano. Los YAC pueden ser también introducidos en células de mamífero. Gracias a la capacidad de estos vectores para aceptar fragmentos grandes de DNA, un solo YAC puede contener un gen entero, que puede ser modificado *in vitro* y expresado en levadura o en células de mamífero, proporcionando información de gran valor sobre la estructura y función de ese gen.

El DNA que se va a clonar se mezcla con el DNA del vector y se ligan los extremos terminales mediante la acción de la enzima *T4 DNA-ligasa*, que permite establecer enlaces covalentes entre los extremos. Posteriormente el DNA se introduce en *E. coli* (cuando se utilizan plásmidos o cósmidos), en la cápsida de un bacteriófago (que infectará células de *E. coli*) o bien en *Saccharomyces cerevisiae*, donde el DNA se replicará al dividirse las células. El conjunto de clones que cubre la totalidad del genoma en estudio se denomina *genoteca* (*library*) (fig. 9.18). En la mayoría de los casos es preciso seleccionar sólo un pequeño fragmento del inserto de interés. Ello se realiza mediante la *subclonación* de dicho frag-



**Fig. 9.18.** Esquema de la construcción de una genoteca en bacteriófago  $\lambda$ . R: lugar de corte para la enzima EcoRI; cos: lugar cohesivo de unión del bacteriófago  $\lambda$ .

mento en un plásmido, el cual permite una manipulación más simple.

No sólo es posible clonar el DNA genómico, sino que el RNA puede copiarse en cDNA de doble hebra e introducirse en el vector apropiado. El RNA debe ser específico del tejido que se desee estudiar, ya que contendrá sólo los genes que se expresan en dicho tejido. El paso de RNA o DNA se realiza mediante el empleo de la enzima *transcriptasa inversa*. Posteriormente se obtiene la hebra complementaria y el cDNA puede ser introducido en el vector.

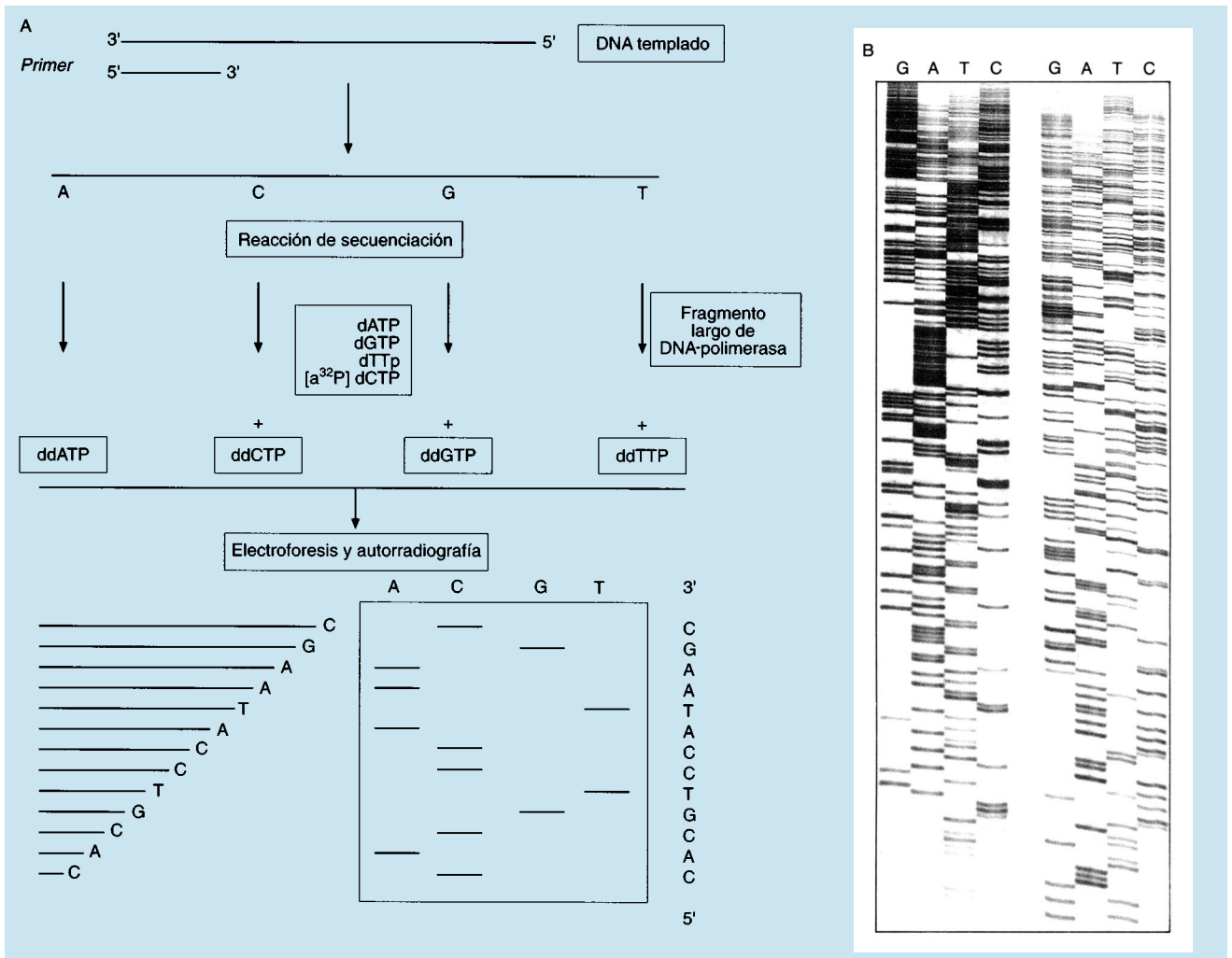
Las genotecas pueden ser analizadas (*screening*) con una sonda genómica o de cDNA, con un oligonucleótido o con un anticuerpo. Los distintos pasos de análisis conducen a obtener el clon único de interés, el cual podrá ser amplificado y purificado para posteriores estudios.

## Secuenciación del DNA

La *secuencia de nucleótidos* de los más de 3.000 millones de pb que contiene el genoma humano aún no se ha determinado. En la actualidad se dispone de una pequeña fracción de ella, la cual corresponde a los pocos genes que han sido clonados y a las secuencias que los flanquean. El pro-

yecto de secuenciar la totalidad del genoma humano requiere la colaboración de muchos laboratorios de todo el mundo y es uno de los principales objetivos científicos de los próximos 10 años.

Existen dos métodos que permiten secuenciar el DNA, uno desarrollado por MAXAM y GILBERT y otro por SANGER. Este último es el más empleado y simple. El DNA que se va a secuenciar (DNA templado) puede estar introducido en un vector o bien puede proceder de una amplificación por el método de la PCR. La reacción de secuenciación se lleva a cabo en presencia de nucleótidos (desoxirribonucleótidos y didesoxirribonucleótidos) y de un cebador *primer* (oligonucleótido). Para la detección se utiliza un desoxirribonucleótido o un *primer* que están marcados radiactivamente. El *primer* se une a las moléculas de DNA templado y, mediante la acción de una polimerasa, las cadenas se van alargando. Las reacciones se bloquean cuando se incorpora un didesoxirribonucleótido, que impide que se forme un enlace con el desoxirribonucleótido siguiente, con lo que se obtiene una *pool* de cadenas de distintos tamaños, cada una de las cuales finaliza en un lugar distinto. El tamaño de los fragmentos obtenidos se puede detectar mediante autorradiografía tras electroforesis en un gel de poliacrilamida. La lectura de los tamaños de los fragmentos obtenidos con cada didesoxirribonucleóti-



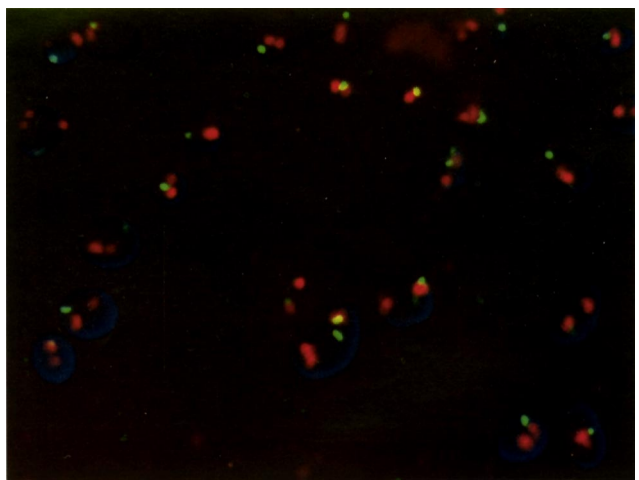
**Fig. 9.19.** Secuenciación del DNA. A. Esquema de los distintos pasos en la secuenciación del DNA mediante didesoxinucleótidos o de Sanger. B. Autorradiografía de la secuenciación de dos clones distintos. dATP, dGTP, dTTP, dCTC: desoxinucleótidos; ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP: dideoxinucleótidos.

do se corresponde con la secuencia complementaria del DNA original en el sentido 3'→5' (fig. 9.19).

En la actualidad es posible proceder a la secuenciación del DNA mediante aparatos que realizan la lectura de los genes de forma automática. Esta tecnología emplea marcadores fluorescentes de cuatro fluorescencias distintas, obteniendo la secuencia de forma mucho más rápida, a la vez que analiza varios clones simultáneamente. El perfeccionamiento de la tecnología de secuenciación automática del DNA permitirá un avance considerable en el estudio del genoma humano.

### Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH, del inglés, *fluorescence in situ hybridisation*) permite la detección y localización de secuencias de ácidos nucleicos en estructuras biológicas morfológicamente conservadas. Esta técnica ha experimentado un enorme desarrollo con aplicaciones en distintos niveles, pudiendo emplearse en el análisis tanto de tejidos como del DNA. El DNA debe encontrarse fijado en un soporte sólido (porta), en forma condensada (cromosomas en metafase) o descondensada (núcleos interfásicos). La separación mínima necesaria en la FISH para visualizar cada



**Fig. 9.20.** Identificación de un paciente con cariotipo XYY en núcleos en interfase, empleando dos sondas fluorescentes. Y: rojo rodamina; X: verde fluoresceína.

sonda como un punto independiente cuando la hibridación se realiza sobre cromosomas metafásicos es de 5-7 megabases (Mb), mientras que si se realiza sobre núcleos interfásicos puede discernirse entre sondas separadas por 50-1.000 ki-



lobases (kb). Mediante FISH pueden detectarse deleciones de pocas kilobases de DNA, aneuploidías y translocaciones. El RNA puede ser estudiado también mediante FISH.

La sonda se marca mediante el método de *nick translation*, utilizando nucleótidos que generalmente tienen incorporada una molécula de biotina o digoxigenina. La sonda marcada se hibrida con el DNA que se encuentra fijado en el porta y posteriormente se trata con una solución que contiene las proteínas avidina o antidigoxigenina unidas a un fluorocromo (fig. 9.20). Estas proteínas reconocen la biotina y la digoxigenina, respectivamente, uniéndose a ellas. El porta se analiza en un microscopio de fluorescencia, que posee filtros específicos para cada fluorocromo (los más utilizados son el TRITC y el FITC). Actualmente existen fluorocromos (fluoresceína, rodamina, hidroxycumarina) que se encuentran incorporados a los nucleótidos, con lo que la visualización de la hibridación es directa.

## Amplificación del DNA (PCR)

En los últimos años se ha desarrollado una nueva y revolucionaria tecnología que facilita los estudios moleculares en el laboratorio y que abre nuevas perspectivas a la investigación y al diagnóstico médico. Esta nueva tecnología se basa en la amplificación de secuencias específicas del DNA. La tecnología que permite tal amplificación se conoce como *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR, del inglés, *polymerase chain reaction*).

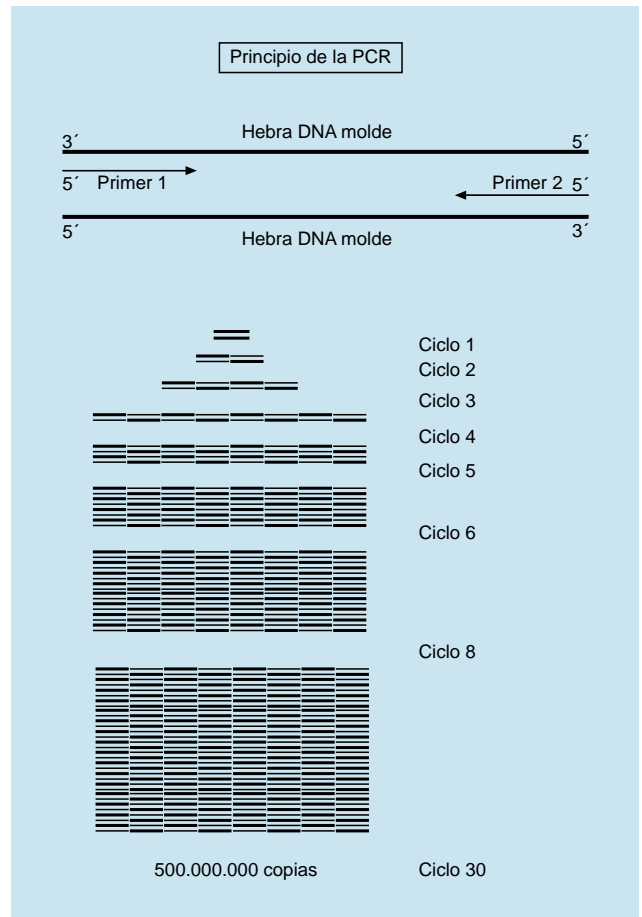
La PCR constituye un sencillo método para la clonación *in vitro* de cualquier segmento de DNA, sin necesidad de recurrir a la metodología convencional. La PCR permite disponer, de forma rápida y eficaz, de cantidades suficientes de una secuencia de DNA determinada para su posterior estudio molecular. La aplicación de la PCR a distintas áreas de la medicina y la biología ha crecido considerablemente en los últimos años, simplificando y magnificando las posibilidades diagnósticas de la tecnología del DNA recombinante. La nueva tecnología permite el diagnóstico preciso de los trastornos genéticos hereditarios o adquiridos y facilita la investigación sobre los defectos moleculares todavía no definidos. La aplicación de la PCR en la medicina forense y legal supone, sin duda, entrar en una nueva era para esta disciplina. Finalmente, la PCR permite la detección de una amplia variedad de patógenos responsables de enfermedades infecciosas.

La revolución que la PCR ha supuesto en el campo de la investigación genética y molecular es comparable a la producida por el descubrimiento de las enzimas de restricción, de los polimorfismos del DNA u otros mecanismos íntimos del funcionalismo celular. El descubrimiento de la PCR le valió a MULLIS el premio Nobel de Química en 1993.

### Principio de la PCR

El método de la PCR se basa en la utilización de secuencias cortas de nucleótidos sintéticos (oligonucleótidos) o *primers*, que hibridan de forma específica con las dos hebras complementarias de DNA, las cuales flanquean la región de interés. La amplificación se consigue al realizar una serie de ciclos repetitivos que consisten en la desnaturalización del DNA molde o templado, la hibridación de los *primers* con el templado y la síntesis del DNA complementario mediante la acción de la enzima *DNA-polimerasa*. Si se realizan 20-30 ciclos del proceso de PCR señalado anteriormente, se pueden obtener varios millones de copias de la secuencia de interés, flanqueada por los *primers* utilizados en la amplificación (fig. 9.21).

La reacción típica de PCR consta del DNA muestra, las secuencias cebadoras o *primers*, el tampón de reacción, los desoxinucleótidos trifosatos y la enzima *DNA-polimerasa* del



**Fig. 9.21.** Esquema del principio de la PCR. El DNA se somete a varios ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación, en presencia de nucleótidos libres, primers y la enzima *Taq* DNA-polimerasa.

DNA. El DNA muestra puede consistir en 100 ng de DNA genómico, lo cual puede suponer hasta 100.000 copias del DNA molde que se desea amplificar, o incluso una única célula, en la que existen sólo 5 pg de DNA (sólo una o dos copias del DNA templado).

De los varios tipos de enzimas DNA-polimerasa existentes, las más utilizadas son las procedentes de *E. coli*, concretamente el fragmento largo de la *DNA-polimerasa I* (*kleenow*). Sin embargo, la actividad de esta enzima desciende considerablemente por encima de los 37 °C, y la exposición a altas temperaturas de desnaturalización necesarias para separar las dos cadenas de DNA inactiva la enzima tras cada ciclo de amplificación. La DNA-polimerasa del microorganismo *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA-polimerasa) permite la síntesis del DNA a temperaturas por encima de los 70 °C y resiste perfectamente los 94-95 °C necesarios para separar las dos hebras de DNA. Con la polimerasa *Taq* se consigue una mayor especificidad en la reacción, además de permitir la *automatización* del proceso. La polimerasa *Taq* es la que se utiliza en la actualidad en la mayoría de los experimentos de amplificación de DNA.

La reacción de amplificación puede realizarse mediante un aparato automático programado para conseguir las temperaturas y los ciclos deseados. Un ciclo típico consiste en la desnaturalización a 94 °C durante 20 seg, la hibridación de los *primers* con el DNA molde a 50-60 °C durante 20 seg y la síntesis a 72 °C durante 30 seg. Los aparatos que existen en el mercado permiten el proceso de amplificación en menos de 3 h.

Una de las extraordinarias particularidades y ventajas de la PCR, de especial importancia en su aplicación diagnóstica, es que permite la amplificación de cualquier secuencia de

DNA, a pesar de que éste se encuentre degradado. Sin embargo, uno de los principales problemas de la PCR es la posibilidad de contaminación con material genético extraño. Esto reviste especial importancia cuando se realiza amplificación de escaso material genético, como puede ser una sola célula (ovocito o esperma) o un pelo, y tiene una relevancia mayor cuando se trata de detectar secuencias como, por ejemplo, las del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) adquirida. La rigurosidad en los diversos procedimientos del laboratorio consigue disminuir la posibilidad de contaminación en la PCR.

Los productos obtenidos en la amplificación pueden analizarse mediante una amplia variedad de técnicas, que incluyen la hibridación mediante *dot-blot*, la simple visualización del producto en geles de agarosa o poliacrilamida, el análisis de restricción o la secuenciación directa del DNA. En el método de *dot-blot* se deposita en un filtro de nilón una parte del producto de la amplificación, que queda fijado mediante irradiación UV o por calor. El filtro se hibrida con el *oligonucleótido específico de secuencia* (SSO) o *específico de alelo* (ASO), marcado radiactivamente o con biotina. Luego los filtros se lavan a la temperatura óptima, exponiéndolos a una película de rayos X (en el caso del marcado radiactivo) u obteniendo la conversión colorimétrica (en el caso del marcado enzimático). También es posible realizar un *dot-blot inverso*, en el que son los oligonucleótidos los que se depositan en el filtro y el DNA amplificado el que, marcado radiactiva o enzimáticamente, actúa como sonda.

## Aplicaciones de la PCR

La PCR ha simplificado y magnificado las posibilidades diagnósticas del DNA en medicina. La nueva tecnología permite el diagnóstico preciso de los trastornos hereditarios, que incluyen tanto los procesos en los que el defecto molecular es conocido en detalle, como aquellos para los que sólo ha sido posible la localización cromosómica del defecto en cuestión. En las enfermedades genéticas adquiridas, como el cáncer y los procesos autoinmunes, la PCR permite detectar con precisión los defectos moleculares que han sido definidos y facilita la exploración de su patología básica. El estudio de la hipervariabilidad en el genoma supone la posibilidad de su empleo en los estudios de susceptibilidad a ciertas enfermedades y la aplicación a la medicina forense y legal. En este campo, el poder discriminativo de la nueva tecnología es altamente superior al obtenido con la metodología clásica. La detección de patógenos infecciosos y la identificación de variabilidad genética asociada a enfermedad se han visto también revolucionadas con la utilización de la tecnología del DNA recombinante.

La PCR en el campo de las enfermedades monogénicas tiene dos aplicaciones principales: *a)* el análisis indirecto de los procesos hereditarios mediante el estudio de polimorfismos asociados a los genes responsables de los distintos procesos y *b)* la detección directa de mutaciones, mediante hibridación, digestión con enzimas de restricción, secuenciación directa del DNA o simple visualización de fragmentos.

Además de la posibilidad de análisis de procesos genéticos, cáncer y susceptibilidad a enfermedad, la nueva tecnología permite el análisis rápido de patógenos infecciosos. El análisis de la presencia de estos patógenos y de mutaciones en oncogenes en material médico de archivo, como bloques de tejidos en parafina, fijados en formol, permite importantes trabajos retrospectivos. A partir de escaso material genético, como pueden ser gotas de sangre seca, pelos, semen, etc., la PCR es también un poderoso método para estudiar muestras de archivo.

La PCR ha revolucionado la tecnología del DNA recombinante en el campo de la investigación genética y molecular. Los métodos de clonación de cDNA y DNA genómico, la manipulación de regiones promotoras de los genes, la secuenciación del DNA, el análisis de la expresión génica, la detec-

ción de mutaciones, los estudios evolutivos, el marcado radiactivo, la mutagénesis *in vitro*, etc., se han visto sustituidos, complementados o altamente facilitados con la PCR. La aplicación de la nueva tecnología en la investigación ha permitido importantes contribuciones sobre la variabilidad, la expresión, la recombinación y la evolución genética.

## Polimorfismos del DNA

### Fragmentos de restricción de longitud polimórfica

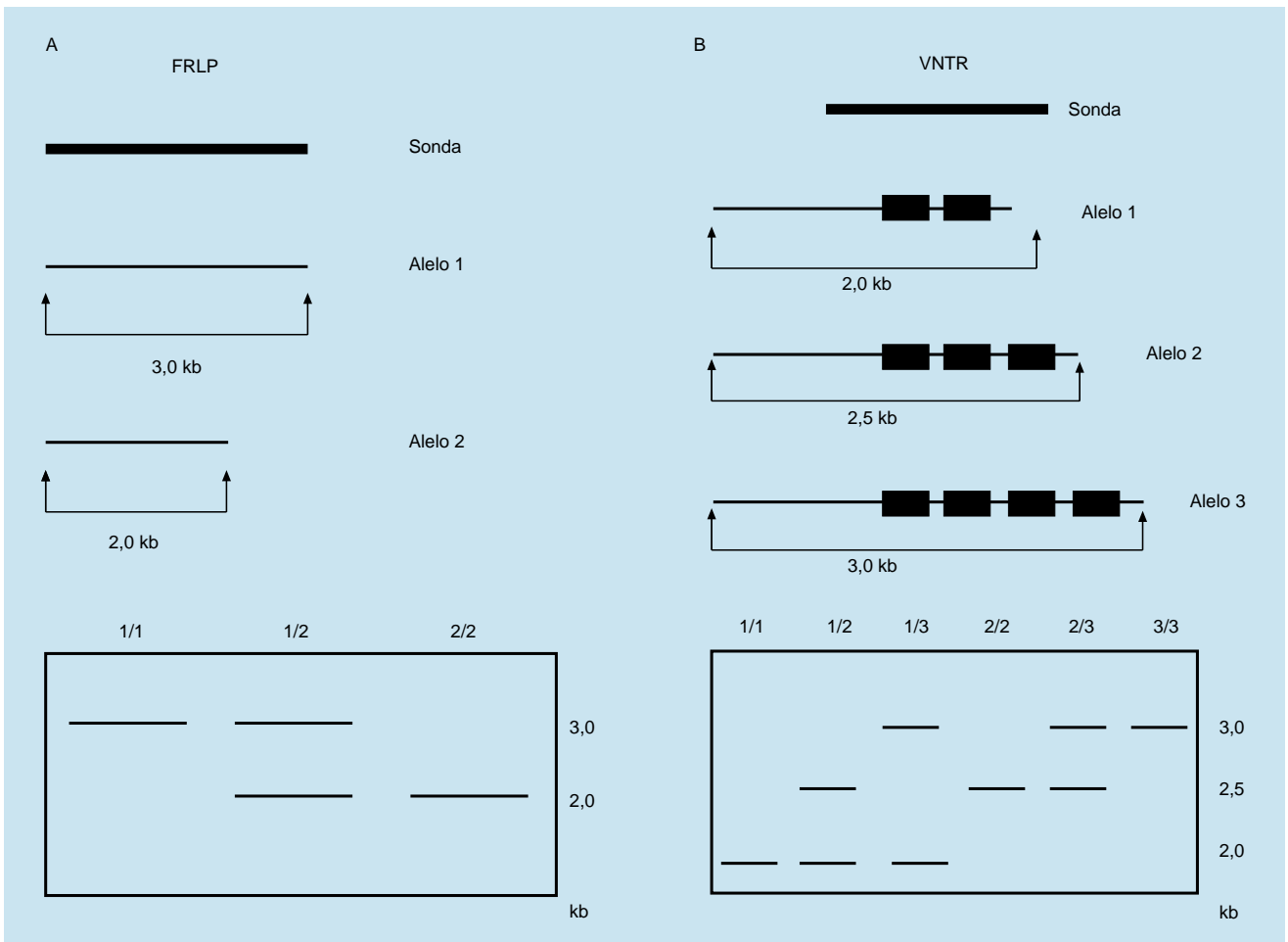
Dentro de la semejanza entre los individuos de una misma especie, existen variaciones individuales en la secuencia de la información genética, la mayoría de las cuales son neutras, sin efecto alguno sobre la información hereditaria. Los polimorfismos consisten en variaciones en la secuencia del DNA, muchas de las cuales no tienen consecuencia biológica selectiva alguna. Esta variación genética debe ser detectable en, al menos, el 1% de los individuos de una población. Los polimorfismos del DNA pueden ponerse de manifiesto con la metodología de que se dispone para el análisis del genoma humano.

La mayoría de los cambios en el DNA se producen en los intrones o entre los genes, no afectando las regiones codificantes para las proteínas. Se estima que uno de cada 200 nucleótidos varía entre los distintos individuos, por lo que se calcula que existen más de 10 millones de lugares polimórficos en nuestro DNA. La gran abundancia de polimorfismos en el DNA contrasta con los escasos polimorfismos proteicos (sólo algunas docenas), que incluyen grupos sanguíneos, grupos tisulares, isoenzimas y antígenos de membrana. Por otra parte, la gran ventaja de los polimorfismos del DNA es la uniformidad metodológica para su estudio, frente a la diversidad de los polimorfismos proteicos.

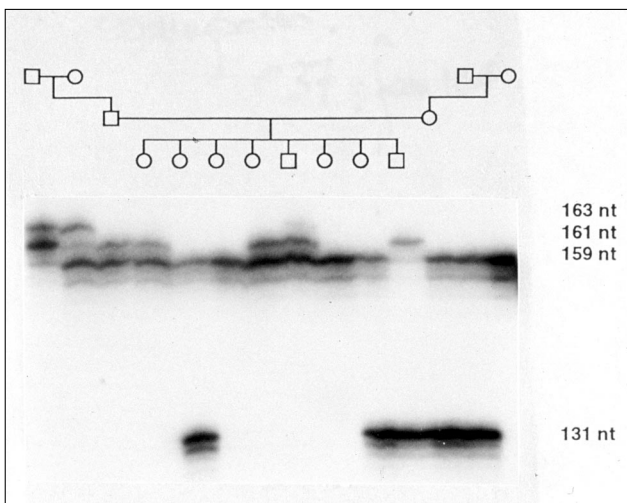
Las enzimas de restricción pueden poner de manifiesto los polimorfismos, ya que un cambio en la secuencia del DNA puede crear o destruir un lugar de corte, dando lugar a un fragmento (destrucción del lugar de corte) o a dos fragmentos (presencia del lugar de corte) (fig. 9.22). Los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP, del inglés, *restriction fragment length polymorphism*) pueden analizarse mediante la amplificación del DNA por PCR. Los primeros RFLP detectados en el hombre fueron en los genes de las globinas, aunque posteriormente se observaron también RFLP en secuencias del DNA no codificantes, denominando a estos últimos anónimos o *extragénicos*, y a los primeros RFLP *intragénicos*. Los polimorfismos del DNA que dependen de su secuencia y que no pueden ser reconocidos mediante enzimas de restricción son los más abundantes y sólo pueden ponerse de manifiesto si se conoce la secuencia de nucleótidos.

### Minisatélites y microsatélites

Existe un tipo de polimorfismos que presentan gran variedad de alelos: son los minisatélites o número variable de secuencias repetidas en tándem (VNTR, del inglés, *variable number of tandem repeats*) y los microsatélites (STRP, del inglés, *short tandem repeat polymorphisms*). Ambos consisten en repeticiones situadas en tándem de un número determinado de nucleótidos, denominándose microsatélites cuando el núcleo repetitivo es inferior a 6 nucleótidos, y minisatélites cuando es superior. El número de veces que se repite este núcleo varía de un individuo a otro, constituyendo distintos alelos (fig. 9.22). Estos marcadores son altamente informativos, ya que presentan gran número de alelos, siendo muy



**Fig. 9.22.** Polimorfismos del DNA. A. Polimorfismo dialélico de restricción. B. Polimorfismo dependiente de secuencias repetitivas en tándem (VNTR). FRLP: fragmentos de restricción de longitud polimórfica; VNTR: número variable de secuencias repetidas en tándem.



**Fig. 9.23.** Análisis de una familia con el marcador microsatélite D21S1234. nt: nucleótidos.

elevada la probabilidad de encontrar dos alelos diferentes en el mismo individuo. Los minisatélites se analizan mediante digestión del DNA con enzimas de restricción y análisis con una sonda que reconoce la zona repetitiva. El análisis de microsatélites se lleva a cabo mediante amplificación con PCR

de la región polimórfica y posterior separación de los fragmentos en un gel de acrilamida (fig. 9.23).

## Polimorfismos e informatividad

Los polimorfismos del DNA son de gran utilidad en el estudio de la patología molecular. No obstante, un polimorfismo de utilidad en los estudios genéticos debe ser informativo. La *informatividad* es la probabilidad de que un individuo sea heterocigoto para el *locus* en estudio. La *heterocigosidad* supone la posibilidad de poder distinguir los dos cromosomas homólogos.

El estudio de un polimorfismo permite determinar su frecuencia alélica, pudiendo calcular la frecuencia de heterocigotos y de homocigotos, así como el *contenido de información polimórfica* o  $PIC = 1 - (p^2 + q^2 + 2 p^2q^2)$  de un FRLP, el cual nos da una idea de su informatividad ( $p$  y  $q$  son las frecuencias de cada alelo). Para un FRLP dialélico situado en un autosoma, el PIC máximo que puede obtenerse es de 0,38, mientras que para un FRLP del cromosoma X es de 0,50. La gran ventaja de los minisatélites y los microsatélites respecto a los FRLP estriba en que la informatividad que se obtiene es muy elevada, debido a la existencia de múltiples alelos, lo que permite obtener PIC cercanos a 1,0.

## Utilidad de los polimorfismos

Los polimorfismos VNTR y microsatélites permiten explorar muchos *loci* de forma rápida y construir lo que se deno-

mina improntas digitales o *fingerprinting* del DNA y explorar la identidad de los individuos, de extrema utilidad en las identificaciones forenses y en medicina legal.

Los polimorfismos del DNA responden a un patrón de herencia mendeliana codominante. Los polimorfismos, principalmente los minisatélites y microsatélites, constituyen la herramienta esencial en la elaboración del mapa del genoma humano. Su empleo ha sido fundamental en los estudios de ligamiento genético para enfermedades monogénicas o poligénicas, permitiendo acotar la localización cromosómica y la posterior clonación de los genes responsables de las principales enfermedades hereditarias.

## HLA y polimorfismos

Las moléculas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) presentan un elevado grado de polimorfismo. El papel exacto de este polimorfismo es todavía desconocido, pero parece estar relacionado con la capacidad del sistema inmunitario para responder a la amplia variedad de antígenos. La PCR se ha aplicado con éxito al estudio de la variabilidad alélica de las subregiones DP, DQ y DR del HLA. El método del *dot-blot* reverso permite aplicar cualquier muestra a un filtro de nilón que contiene todas las variantes posibles de estos *loci* en forma de oligonucleótidos. Este método constituye una forma rápida y precisa de analizar los polimorfismos del HLA de clase II (véase más adelante). La PCR permite además trabajar con escasa muestra biológica, siendo el método más preciso, simple y rápido para realizar tipificación de HLA, de aplicación para el trasplante de tejidos, la identificación de individuos y los estudios de susceptibilidad a diversas enfermedades.

## Diagnóstico genotípico

### Estrategias diagnósticas

La tecnología del DNA recombinante ha tenido un impacto revolucionario en el diagnóstico prenatal y la detección de portadores de enfermedades monogénicas. A pesar de que esta tecnología no ha cubierto el espectro total de sus posibilidades diagnósticas, se ha difundido con gran rapidez permitiendo aumentar las opciones de los laboratorios en el diagnóstico molecular. Antes de 1987, el diagnóstico prenatal de enfermedades como la anemia de células falciformes, la betatalasemia y las hemofilias se realizaba mediante tecnología de *Southern blotting*, tardándose varias semanas en la obtención de los resultados de este tipo de análisis. Desde finales de 1987 es posible establecer el diagnóstico de estos procesos en menos de una semana mediante la amplificación proporcionada por la PCR. Esta nueva tecnología no sólo ha aumentado la rapidez diagnóstica, sino que ha permitido un considerable incremento en su fiabilidad.

#### Análisis indirecto

Para muchas de las enfermedades hereditarias monogénicas la detección de portadores y el diagnóstico prenatal sólo son posibles analizando polimorfismos del DNA que se encuentran ligados a los genes responsables de estos procesos, es decir, mediante el estudio de polimorfismos y el seguimiento de su herencia en una familia determinada (véase Consejo genético y diagnóstico).

#### Análisis directo

En enfermedades para las que es conocido el gen, como la anemia de células falciformes, la betatalasemia, la alfatala-

semia, la distrofia muscular de Duchenne, la hemofilia, el retinoblastoma o la fibrosis quística, es posible utilizar técnicas (SSCP –*single strand conformation polymorphism*–, DGGE –*denaturing gradient gel electrophoresis*–, heterodúplex, etc.) que permiten detectar las mutaciones responsables de esa enfermedad (diagnóstico directo). En la mayoría de estas técnicas se usa la amplificación por PCR.

## Otras aplicaciones del diagnóstico genotípico

### Afecciones neoplásicas

En los últimos años, las investigaciones sobre las bases moleculares del cáncer se han dirigido a la identificación de las alteraciones responsables del desarrollo de tumores y a la caracterización de los genes que controlan el crecimiento y la diferenciación de las células en la carcinogénesis. Se ha aislado un amplio número de genes relacionados con el cáncer, los cuales contienen mutaciones específicas que pueden ser identificadas a partir de material genético del tumor. Los reordenamientos cromosómicos específicos asociados a ciertas leucemias son marcadores diagnósticos de gran utilidad, los cuales pueden ser detectados mediante PCR.

### Medicina legal y forense

La posibilidad de detectar polimorfismos del DNA en cualquier muestra biológica ha constituido una revolución para la medicina legal y forense. El empleo de la PCR ha mejorado considerablemente la utilización de la variabilidad alélica en los estudios de identificación, sobre todo con el empleo de minisatélites y microsatélites. La PCR permite realizar una tipificación a partir de un solo pelo, de una sola célula, un único espermatozoide o una gota de sangre seca, a pesar de que el material biológico se encuentre degradado.

Los sistemas de marcadores para análisis mediante PCR, de utilidad en medicina forense, deben ser altamente polimórficos y tener un elevado nivel de heterocigosidad genética. La secuencia que se ha de estudiar debe ser amplificable con facilidad; del mismo modo, la detección de la variación alélica debe ser reproducible. Es necesario también disponer de las frecuencias genotípicas para estimar el poder de discriminación de los marcadores. Si los marcadores empleados se heredan de forma independiente (proceden de distintos cromosomas), las frecuencias derivadas de un sistema de marcadores pueden multiplicarse por las obtenidas con otros sistemas, aumentando el poder discriminativo del total del sistema.

Uno de los sistemas mejor desarrollados para el análisis forense mediante PCR es el DQ $\alpha$  del HLA. El segundo exón del gen DQ $\alpha$  es altamente variable. Una vez amplificada esta región del DNA, es posible emplear un oligonucleótido específico de sonda para la detección de cada una de las secuencias variantes o alelos (ASO). Los genotipos que se obtienen muestran frecuencias que van de 0,005 a 0,15, teniendo un poder de discriminación del 0,93; es decir, altamente superior al conseguido con los grupos sanguíneos ABO, que es sólo del 0,60. El *locus* DP $\beta$  aumenta considerablemente el poder de discriminación obtenido con el sistema DQ $\alpha$ .

Otro sistema altamente polimórfico es el que se encuentra en la región *D-loop* del DNA mitocondrial humano. La hipervariabilidad presente en el DNA mitocondrial tiene una gran ventaja frente al DNA genómico, ya que existen entre 100 y 10.000 copias de una secuencia determinada de DNA mitocondrial por célula, comparado con una sola copia de DNA genómico, lo que representa una gran ventaja cuando se dispone de escasa muestra biológica.

Los marcadores del DNA que detectan regiones hipervariables VNTR y los microsatélites permiten distinguir a dos individuos entre millones de individuos. Los microsatélites tienen además la ventaja de que pueden analizarse mediante

PCR al nivel de la secuencia del DNA. Estos marcadores son los de mayor utilidad en estudios de paternidad.

Cualquier muestra biológica puede ser analizada mediante PCR, sin importar sus características o su tamaño. De este modo, manchas de esperma, gotas de sangre, pelos, células epiteliales bucales, muestras de autopsia conservadas en formol, etc., pueden ser estudiadas con estos sistemas hipervariables y PCR. El estado de degradación del DNA en la muestra biológica no representa un gran problema para la PCR, ya que muchos de los fragmentos que se desea analizar son de alrededor de 100 pb. Mediante esta metodología ha sido posible estudiar muestras de restos humanos de hace más de 7.000 años.

Uno de los principales problemas en la PCR es la posibilidad de contaminación con muestras de otros individuos, incluido el que las manipula. En cada estudio deben realizarse controles positivos y negativos que permitan monitorizar la tecnología y la posibilidad de contaminación.

### Diagnóstico de procesos infecciosos

En el campo de la microbiología la tecnología del DNA recombinante ha aportado considerables avances, al permitir la detección rápida y específica de todo tipo de patógenos: virus, bacterias y hongos. La PCR permite amplificar una secuencia de DNA de interés en cuestión de pocas horas, y ocupará un papel fundamental en el diagnóstico, frente a los métodos clásicos de cultivo, los cuales requieren días e incluso semanas, especialmente para procesos en los que el cultivo es muy difícil o imposible. Por otra parte, la PCR permite realizar el análisis a partir de escaso material genético, como el obtenido en una biopsia, un lavado o una punción aspirativa.

Los anticuerpos monoclonales o policlonales se utilizan para la detección de gran variedad de procesos infecciosos. Estos anticuerpos pueden reaccionar con otros patógenos distintos y, por consiguiente, impedir el diagnóstico fiable o precisar una amplia batería de anticuerpos para establecer el diagnóstico específico. Por otra parte, los métodos inmunológicos no permiten detectar el proceso infeccioso en el momento en el que éste se produce, sino varias semanas después. Por último, ciertos agentes infecciosos comprometen seriamente el sistema inmunitario, o éste se encuentra ya muy afectado, como en el caso de las inmunodeficiencias congénitas y adquiridas (como el SIDA), de los pacientes sometidos a tratamiento antineoplásico o afectados de procesos cancerosos. En estas situaciones, la detección serológica de los procesos infecciosos es muy difícil.

Existen varios retrovirus humanos que han sido caracterizados, entre ellos los virus HIV-1 y HIV-2, responsables del SIDA. Los cultivos del virus en individuos seropositivos y en aquellos que padecen la infección tienen una amplia variedad y son altamente laboriosos, largos y costosos. La PCR se ha aplicado con éxito en la detección de individuos infectados, permitiendo el diagnóstico antes del desarrollo de anticuerpos. El método permite establecer un diagnóstico preciso en aquellos casos en los que los estudios inmunológicos son dudosos, así como demostrar la infección en individuos seropositivos para los que los métodos de detección directa del virus son negativos. El método ha mostrado gran utilidad para el análisis en recién nacidos, para análisis pretransfusional y para determinar el tipo de virus presente en el indivi-

duo. Uno de los principales problemas con los virus HIV-1 y 2 es la gran heterogeneidad molecular de ciertas regiones del genoma de estos virus, por lo que es preciso emplear secuencias que se encuentran altamente conservadas.

Los virus HTLV-I y II son retrovirus que infectan los linfocitos. El virus HTLV-I se asocia a un tipo de leucemia muy grave, que se conoce como leucemia de células T del adulto, así como a una mielopatía crónica progresiva. En muchos países, el análisis serológico para el HTLV-I es obligatorio para los bancos de sangre. La PCR es de gran utilidad clínica al permitir identificar a los individuos infectados antes de que se produzca la seroconversión, confirmando además la presencia del virus para los casos detectados mediante métodos serológicos. El virus HTLV-II se encuentra de forma epidémica en drogadictos; por otra parte, la detección de este virus mediante PCR permitirá establecer su relación con procesos específicos todavía no claros.

La PCR ha aumentado considerablemente la sensibilidad (más de 10.000 veces) de la detección del virus de las hepatitis B y C, permitiendo detectar el virus en pacientes seronegativos. La infección por citomegalovirus (CMV) es de especial importancia para los recién nacidos, al ser responsable de retraso mental y de sordera congénita no hereditaria. En los individuos inmunodeprimidos el CMV es un agente patógeno grave. La detección temprana de la presencia del virus mediante PCR permite la rápida instauración de una terapéutica eficaz, la cual no sería posible mediante el cultivo del virus. Éste puede ser detectado en la orina de recién nacidos, de pacientes afectados de SIDA y de enfermos sometidos a tratamiento inmunodepresor y trasplantados, entre otros.

Se han identificado varios tipos de papilomavirus humanos que se encuentran asociados a displasia de cuello uterino y a carcinoma (tipos 16 y 18) o a condiloma benigno (tipos 6 y 11). La posibilidad de realizar la tipificación de estos virus en las muestras genitales permite elucidar el papel que cumplen en estos procesos, particularmente en el cáncer de cuello uterino. Por otra parte, la presencia de los tipos de virus asociados con mayor frecuencia a la transformación maligna permite monitorizar el seguimiento de las pacientes en las que se demuestre la presencia de estos tipos virales.

### Bibliografía especial

- BOTSTEIN D, WHITE RL, SKOLNICK M, DAVIS RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1980; 32: 314-331.
- BURKE DT, CARLE GS, OLSON MV. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 1987; 236: 806-812.
- ERLICH HA, GELFAND DH, SAIKI RK. Specific DNA amplifications. *Nature* 1988; 331: 461-462.
- NAKAMURA Y, LEPPERT M, O'CONNELL P, WOLFF R, HOLM T, CULVER M et al. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 1987; 235: 1.616-1.622.
- OU CY, KWOK S, MITCHELL SW, MACK DH, SNINSKY JJ, KREBS JW et al. DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science* 1988; 239: 295-297.
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5.463-5.467.
- SOUTHERN EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503-518.
- WEBER J, MAY P. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 388-396.

# Patología molecular hereditaria

X. Estivill Pallejà

La patología molecular de algunas de las enfermedades monogénicas es bien conocida. En unos casos el gen responsable se ha aislado a partir de la proteína para la que codifica, mientras que en otros ha sido necesario recurrir a su identificación en función de la posición que éste ocupa en el genoma, estrategia conocida como *clonación posicional* o *genética reversa*.

Del total de 100.000 genes que se estima forman parte de nuestro material genético, sólo se han identificado unos 3.000. El considerable número de genes que todavía no conocemos (más del 95%) difícilmente se descubrirán empleando métodos bioquímicos que permitan detectar los distintos productos proteicos de nuestro organismo. El enorme éxito de la clonación posicional, identificando los genes de las principales enfermedades hereditarias, hace albergar enormes esperanzas de que la mayoría de los genes implicados en procesos patológicos serán descubiertos en función del lugar que ocupan en el genoma. De hecho, en los últimos 5 años el progreso alcanzado ha sido extraordinario y se ha identificado un considerable número de genes para los que no existía información bioquímica alguna. En este apartado se describen algunas de las enfermedades hereditarias para las que se han producido importantes avances en el conocimiento molecular. La limitación de espacio no permite una descripción exhaustiva ni cubrir la totalidad de la patología molecular que es posible analizar en la actualidad.

humanas tienen la estructura de un tetrámero. La Hb adulta y fetal está formada por cadenas  $\alpha$ , combinadas con cadenas  $\beta$  en la Hb A ( $\alpha_2 \beta_2$ ), cadenas  $\delta$  en la Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2 \delta_2$ ) y cadenas  $\gamma$  en la Hb F ( $\alpha_2 \gamma_2$ ). En la vida embrionaria las cadenas  $\zeta$  se combinan con las  $\epsilon$  y  $\gamma$  para formar la *Hb Gower 1* ( $\zeta_2 \epsilon_2$ ) o la *Hb Portland* ( $\zeta_2 \gamma_2$ ), y las cadenas  $\alpha$  y  $\epsilon$  se combinan para formar la *Hb Gower 2* ( $\alpha_2 \epsilon_2$ ) (fig. 9.24).

Los genes de la Hb están divididos en dos familias, los que codifican para las cadenas  $\alpha$ , situados en el cromosoma 16p, y los que codifican para las cadenas  $\beta$ , localizados en el cromosoma 11p.

La familia de los genes  $\alpha$  está formada por cuatro genes funcionales ( $\zeta_2$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$  y  $\theta_1$ ), de los que sólo los genes  $\alpha_2$  y  $\alpha_1$  se expresan en la vida adulta, y los tres pseudogenes ( $\psi\zeta$ ,  $\psi\alpha_2$  y  $\psi\alpha_1$ ). Estos genes y pseudogenes se encuentran en una región genómica que comprende unas 30 kilobases (kb). Los dos genes  $\alpha$  ( $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ) tienen tres exones y dos intrones, son idénticos en la región codificante y difieren en pocos nucleótidos en los intrones y en la región intergénica. El producto proteico final de los genes  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  es idéntico.

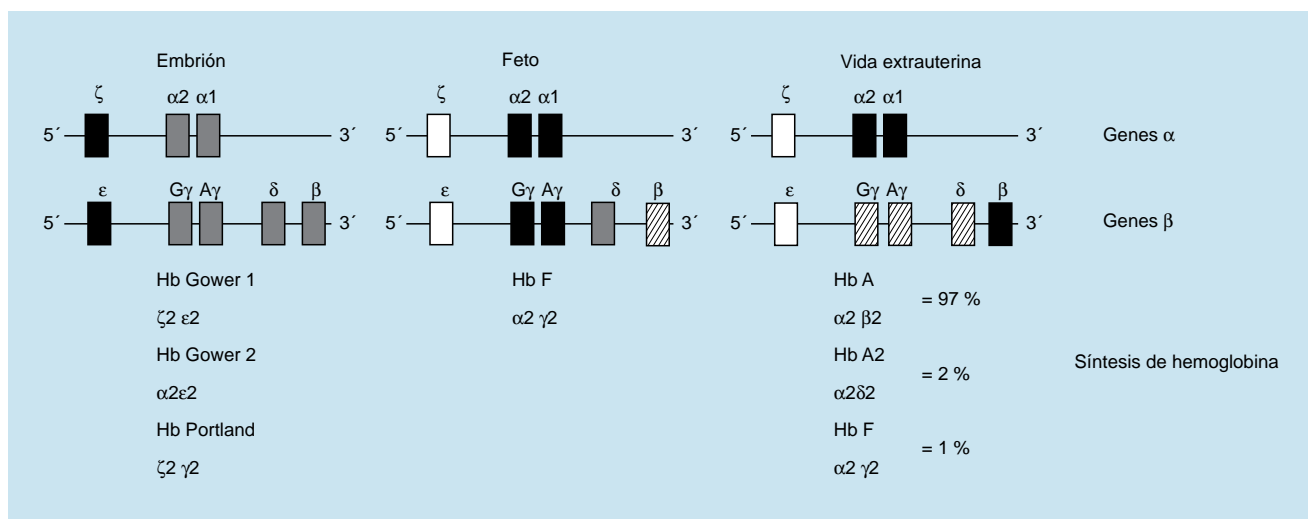
La familia de los genes  $\beta$  está formada por cinco genes funcionales ( $\epsilon$ ,  $\zeta\gamma$ ,  $\alpha\gamma$ ,  $\delta$  y  $\beta$ ), y por un pseudogén  $\beta_1$ . Los genes funcionales tienen tres exones y dos intrones. El gen  $\epsilon$  se expresa sólo en la vida embrionaria, mientras que los genes  $\zeta\gamma$  y  $\alpha\gamma$  están activos en el período fetal. El gen  $\beta$  se expresa a partir de la décima semana de vida intrauterina, y el gen  $\delta$  sólo lo hace tras el nacimiento, aunque a un bajo nivel.

Las regiones que flanquean las secuencias codificantes de los genes de las hemoglobinas han sido analizadas en detalle. En el extremo 5' existen secuencias que regulan la transcripción de estos genes: una secuencia conocida como *TATA box*, situada a 20-30 pares de bases (pb) antes del lugar de iniciación del RNA, y otra secuencia denominada *CCAAT box*, a 70-90 pb. A varias decenas de kilobases del *cluster* de genes  $\beta$ , en situación 5', existen unas secuencias denominadas *lcr*, que regulan la expresión de la  $\beta$ -globina. Se han identificado distintas alteraciones moleculares responsables de las enfermedades de la Hb. Estas alteraciones comprenden las variantes estructurales –entre las que destacan las Hb S, C y E–, las talasemias y la persistencia hereditaria de Hb fetal.

## Hemoglobinopatías

Las hemoglobinopatías han sido ampliamente estudiadas en el plano molecular. Gran parte de nuestros conocimientos sobre la patología molecular humana tienen su origen en el estudio de estas afecciones.

Los cambios en las distintas moléculas de la hemoglobina (Hb) responden a las necesidades de adaptación a los distintos requerimientos de oxígeno durante el desarrollo. Las Hb



**Fig. 9.24.** Control genético de la síntesis de hemoglobina humana. En negro se señalan los genes activos; en rayado, los genes poco activos; en sombreado, los genes que todavía no son activos, y en blanco, los genes que han pasado de activos a no funcionales.



## Variantes estructurales de la hemoglobina

Existen más de 500 variantes estructurales de la Hb. La mayoría de ellas consisten en el cambio de un aminoácido en las cadenas  $\alpha$  o  $\beta$  y generalmente no producen enfermedad, debido a que no implican un cambio funcional en la molécula final. Estas mutaciones se denominan de cambio de sentido (*missense*). Las variantes más frecuentes y de importancia clínica son las Hb S, C y E (tabla 9.5).

La Hb S se encuentra distribuida ampliamente en África tropical, el Mediterráneo y el Oriente Medio. Esta distribución geográfica parece tener relación con una ventaja selectiva para los heterocigotos Hb C / Hb A, al estar protegidos contra el paludismo. La enfermedad debida al estado homocigoto se conoce como drepanocitosis o anemia de células falciformes. Las características clínicas de la drepanocitosis se describen en la sección de Hematología, pero cabe destacarse la extrema gravedad del proceso, que se caracteriza por anemia, lesiones óseas, del SNC y renales; durante las crisis hemolíticas pueden producirse infartos. En África, la mayoría de los pacientes homocigotos no sobreviven más allá del primer año de vida y pocos llegan a la edad adulta.

La Hb S se debe a la sustitución de una valina por un ácido glutámico de la  $\beta$ -globina. Esta sustitución se debe a una mutación puntual A  $\rightarrow$  T en el codón 6. Inicialmente se sugirió un origen único de la mutación, pero los estudios de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) cercanos al gen de la  $\beta$ -globina ha puesto en evidencia haplotipos específicos de poblaciones distintas, estableciendo al menos tres orígenes en África y uno en Asia. La identificación del defecto molecular de la anemia de células falciformes permite el diagnóstico prenatal genotípico de la enfermedad. Esta enfermedad monogénica es la más frecuente en la población mundial, con una incidencia de 1/40 en África y de 1/400 en la población negra americana. Se calcula que en África nacen unos 100.000 niños con anemia de células falciformes cada año.

La Hb C consiste en la sustitución de un ácido glutámico por lisina en la  $\beta$ -globina, debido a una mutación puntual G  $\rightarrow$  A en el codón 6. La mutación se encuentra principalmente en el oeste de África. Los homocigotos para la Hb C padecen una anemia hemolítica moderada. Es posible en-

contrar casos de heterocigotos Hb C / Hb S, cuya gravedad es superior a la de los homocigotos para Hb C.

La Hb E consiste en el mismo cambio que en la Hb C, pero en el codón 26, en lugar del 6. Los homocigotos para la Hb E tienen una anemia moderada, apenas sintomática. En ciertas regiones del sudeste asiático el índice de portadores es superior al 50%. La herencia de Hb E no justifica el análisis genotípico para el diagnóstico prenatal, aunque en ciertos casos puede encontrarse asociada a otros defectos de la Hb que producen anemia grave.

## Síndromes talasémicos

Este grupo de alteraciones genéticas se caracteriza por la disminución en la producción de una o varias de las cadenas de la hemoglobina. Se clasifican en talasemia  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta\beta$  y  $\epsilon\gamma\delta\beta$ , según cuál sea la cadena de Hb alterada, y se distinguen en  $\alpha^+$  o  $\beta^+$ , y  $\alpha^0$  o  $\beta^0$ , en función de que la síntesis de la cadena  $\alpha$  o  $\beta$  se encuentre disminuida o esté ausente. Las consecuencias clínicas de las talasemias reflejan los problemas derivados de la producción insuficiente (o nula) de Hb y el efecto nocivo de las otras cadenas de Hb que se producen en exceso.

### Alfatasemias

Las deleciones son el defecto molecular más frecuente en las  $\alpha$ -talasemias. Según el número de genes delecionados es posible establecer distintos genotipos patológicos: rasgo  $\alpha^+$ , tres genes funcionales ( $\alpha\alpha/\alpha$ ); rasgo  $\alpha^0$ , dos genes funcionales ( $\alpha\alpha/-$ ); hemoglobinosis H, un gen funcional ( $-\alpha/-$ ), e hidropesía fetal, ningún gen funcional ( $-/-$ ). Las deleciones de un solo gen  $\alpha$  se encuentran principalmente en el Mediterráneo, África y Asia.

Existen dos tipos principales de deleción  $\alpha^+$ ; en uno de ellos la deleción es de 3,7 kb, afecta la mitad del gen  $\alpha_2$  y la mitad del gen  $\alpha_1$ , dando como resultado un gen híbrido  $\alpha_2\alpha_1$ ; el otro tipo de deleción es de 4,2 kb y afecta la totalidad del gen  $\alpha_2$ . Las deleciones en los genes  $\alpha$  respetan generalmente el gen  $\zeta$ , el cual es funcional en la vida embrionaria. De este modo, los niños con hidropesía fetal, los cuales son homocigotos para estas deleciones, pueden producir Hb *Portland* ( $\zeta_2\gamma_2$ ) y sobreviven hasta el nacimiento, y mueren a consecuencia de un cuadro de anasarca fetoplacentaria.

Existen dos tipos de talasemia  $\alpha^+$ , las debidas a deleciones y las producidas por mutaciones puntuales. Las deleciones son debidas a la ausencia de un solo gen  $\alpha$ . Las mutaciones responsables de talasemia  $\alpha^+$  son muy variadas, afectando la región codificante o regiones que participan en la regulación del mRNA. Las principales deleciones en el *cluster* de los genes de la  $\alpha$ -globina se describen en la figura 9.25.

### Betatalasemias

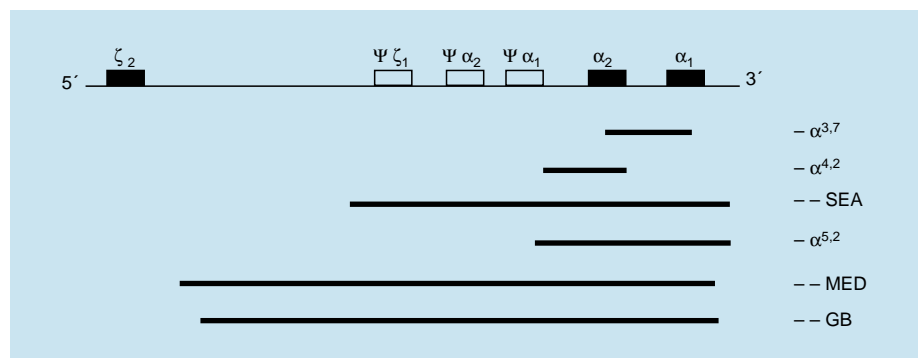
Se han descrito más de un centenar de mutaciones en el gen de las  $\beta$ -globinas en pacientes con  $\beta$ -talasemia. Estas mu-

**TABLA 9.5.** Mutaciones del gen  $\beta$  en algunas de las hemoglobinas anormales

Denominación	Mutación de proteína	Mutación de DNA	Detección
Hb S	$\beta^6$ glu $\rightarrow$ val	GAG $\rightarrow$ GTG	DdeI o MstII ASO
Hb C	$\beta^6$ glu $\rightarrow$ lys	GAG $\rightarrow$ AAG	ASO
Hb E	$\beta^{26}$ glu $\rightarrow$ lys	GAG $\rightarrow$ AAG	ASO

ASO: oligonucleótidos específicos de alelos.

**Fig. 9.25.** Representación de las distintas deleciones que pueden encontrarse en el cluster de genes  $\alpha$  que dan origen a distintas formas de  $\alpha$ -talasemia. Las barras señalan la extensión de las deleciones.  $-\alpha^{3.7}$ : deleción de 3,7 kb;  $-\alpha^{4.2}$ : deleción de 4,2 kb;  $-\alpha^{5.2}$ : deleción de 5,2 kb; SEA: sudeste asiático; MED: Mediterráneo; GB: Gran Bretaña.



taciones originan dos tipos de cuadros clínicos: la talasemia  $\beta^0$ , en la que no se producen cadenas  $\beta$ , y la talasemia  $\beta+$ , en la que existe una producción parcial de globina  $\beta$ .

Las mutaciones descritas en el seno del gen de la  $\beta$ -globina son de cinco tipos: *a) sin sentido (nonsense)*, debidas al cambio de una base creando un codón de *stop* prematuro; *b) mutaciones de corrimiento del molde (frameshift)* de lectura, las cuales se deben a inserciones o deleciones de una o dos bases, que originan un mRNA no funcional; *c) mutaciones que alteran el splicing del mRNA*, pudiendo ocasionar un mRNA no funcional en su totalidad o sólo parcialmente según el tipo de mutación; *d) mutaciones en el lugar de poliadenilación del mRNA*, con efecto regulador negativo en la expresión del gen  $\beta$ , y *e) mutaciones en la región promotora del gen*, que pueden disminuir el grado de transcripción del gen. Las mutaciones sin sentido y las de corrimiento de molde, así como algunas que alteran el *splicing* del mRNA, producen talasemia  $\beta^0$ , mientras que las mutaciones en la región promotora, las de poliadenilación y la mayoría de las que afectan el *splicing* del mRNA causan talasemia  $\beta+$ .

En la **tabla 9.6** se relacionan las mutaciones betatalasémicas más frecuentes en las distintas poblaciones. La distribu-

ción geográfica de las mutaciones betatalasémicas no es uniforme. Cada mutación se encuentra de forma predominante en una población determinada; por otra parte, en una misma población coexiste una amplia variedad de mutaciones. Por ejemplo, una mutación sin sentido que produce un *stop* en el codón 39 se encuentra distribuida ampliamente en el Mediterráneo, constituyendo alrededor del 30% del total de mutaciones betatalasémicas en esta zona, pero en la isla de Cerdeña esta mutación supera el 90%.

Las  $\delta\beta$ -talasemias y la persistencia hereditaria de Hb F (PHHF) son el resultado de grandes deleciones en el seno del *cluster* de los genes  $\beta$  (**fig. 9.26**). Las deleciones en el gen  $\beta$  son más raras que las mutaciones puntuales. Existen deleciones que suponen la pérdida de hasta 100 kb. Las consecuencias clínicas de estas deleciones son variables. Según el grado de compensación de la pérdida del gen  $\beta$  que se produce con la expresión de uno o de ambos genes  $\beta$ , pueden existir cuadros clínicos distintos: un síndrome talasémico grave (talasemia  $\beta^0$  delecional), un síndrome talasémico moderado ( $\delta\beta$ -talasemia) o un estado clínico completamente normal (PHHF), en el que la ausencia de cadenas  $\delta$  y  $\beta$  se compensa mediante la producción de cadenas  $\gamma$ .

**TABLA 9.6.** Principales mutaciones en el gen  $\beta$  responsables de la  $\beta$ -talasemia

Mutación	Población	Frecuencia (%)	Tipo de $\beta$ -talasemia
Codón 39 C $\rightarrow$ T <i>nonsense</i>	Mediterránea	30	0
IVS-1 posición 110 G $\rightarrow$ A <i>splicing</i>	Mediterránea	35	+
IVS-1 posición 6 T $\rightarrow$ C <i>splicing</i>	Mediterránea	10	+
IVS-1 posición 745 C $\rightarrow$ G <i>splicing</i>	Mediterránea	5	+
IVS-1 posición 1 G $\rightarrow$ A <i>splicing</i>	Mediterránea	10	0
IVS-2 posición 1 G $\rightarrow$ A <i>splicing</i>	Mediterránea	10	0
Promotor-87 C $\rightarrow$ G	Mediterránea	1	+
IVS-1 posición 5 G $\rightarrow$ C <i>splicing</i>	India	35	+
-29 TATA box	Negra (EE.UU.)	40	+
Poliadenilación T $\rightarrow$ C (EE.UU.)	Negra (EE.UU.)	25	+
IVS-2 posición 654 C $\rightarrow$ T <i>splicing</i>	China	40	0
Codón 71/72 del 1 <i>frameshift</i>	China	49	0

IVS: *intervening sequence* (intrón); 0: ausencia de producción de  $\beta$ -globina; +: síntesis parcial de proteína. (Modificada de ANTONARAKIS SE, KAZAZIAN HH Jr, ORKIN SH. *DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters*. Human Genet 1985; 69: 1-14.)

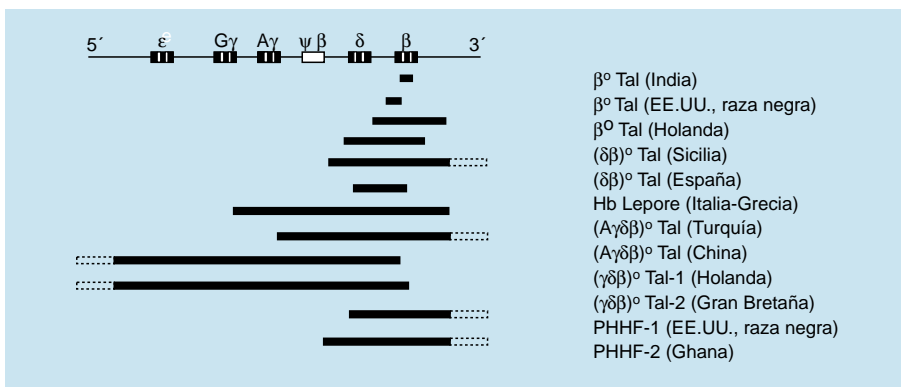
## Patología molecular de la coagulación: hemofilia y trombofilia

### Hemoflias

Las hemoflias son enfermedades hemorrágicas causadas por el déficit de los factores VIII (hemofilia A) o IX (hemofilia B) de la coagulación. Son enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X, en las que las mujeres transmiten el defecto sin padecer la enfermedad. La detección de pacientes portadoras de estas enfermedades es difícil mediante la dosificación de los factores de la coagulación, por lo que el aislamiento de los genes de los factores VIII y IX y el reconocimiento de su patología han representado un avance considerable.

### Hemofilia A

La incidencia de la hemofilia A es de uno de cada 5.000 nacimientos. El gen que codifica para el factor VIII se localiza en la región q28 del cromosoma X. Es un gen de una longitud de 186 kb, con un total de 26 exones. El mRNA del gen del factor VIII mide aproximadamente 9 kb y la proteína para la que codifica tiene 2.351 aminoácidos. En la hemofilia A existe una intensa heterogeneidad fenotípica, con casos muy graves en los que el nivel de producción de factor VIII es in-



**Fig. 9.26.** Principales deleciones en el *cluster* de los genes de la  $\beta$ -globina. Las barras señalan la extensión de las deleciones. Entre paréntesis se indica la población en la que se ha observado la deleción. Las líneas continuas en negro señalan la región delecionada; las líneas discontinuas indican que la deleción va más allá de las zonas señaladas en la figura.



ferior al 1%, casos moderados con una producción del 1-5% y casos benignos en que se produce más de un 5% de proteína.

El análisis molecular de la hemofilia A es difícil debido a las grandes dimensiones del gen y a que alrededor de un tercio de los casos son el resultado de mutaciones *de novo*. Las deleciones en el gen del factor VIII representan menos del 4% de los casos. En el gen del factor VIII se han detectado mutaciones *missense*, *nonsense*, *frameshift*, deleciones, inserciones y duplicaciones. Algunas mutaciones se han observado de forma recurrente, debido a que se producen en el dinucleótido CG, pero la mayoría de los casos son debidos a mutaciones independientes en cada familia. El estudio exhaustivo de cada paciente con hemofilia permite detectar las distintas mutaciones en la mayoría de los casos de hemofilia moderada o leve, mientras que en la mitad de los casos graves no ha sido posible identificar la mutación responsable. Recientemente se ha detectado que el 45% de estos casos graves se deben a una inversión en el seno del gen del factor VIII, que interrumpe el gen y origina una proteína truncada no funcional. La inversión se debe a la recombinación entre secuencias homólogas situadas en el intrón 22 del gen del factor VIII y dos genes situados en dirección opuesta, a unas 500 kb, 5' respecto al gen del factor VIII. Dado que los casos graves de hemofilia A representan aproximadamente el 50%, los casos debidos a inversiones en el gen del factor VIII constituyen el 25% de todos los casos de hemofilia A (fig. 9.27).

Debido a las dificultades en la detección directa de los defectos moleculares responsables de la hemofilia A y a la elevada incidencia de mutaciones nuevas, el análisis genético puede realizarse siguiendo la segregación en cada familia del alelo mutado, ligado a marcadores polimórficos intragénicos, especialmente del tipo de los microsatélites.

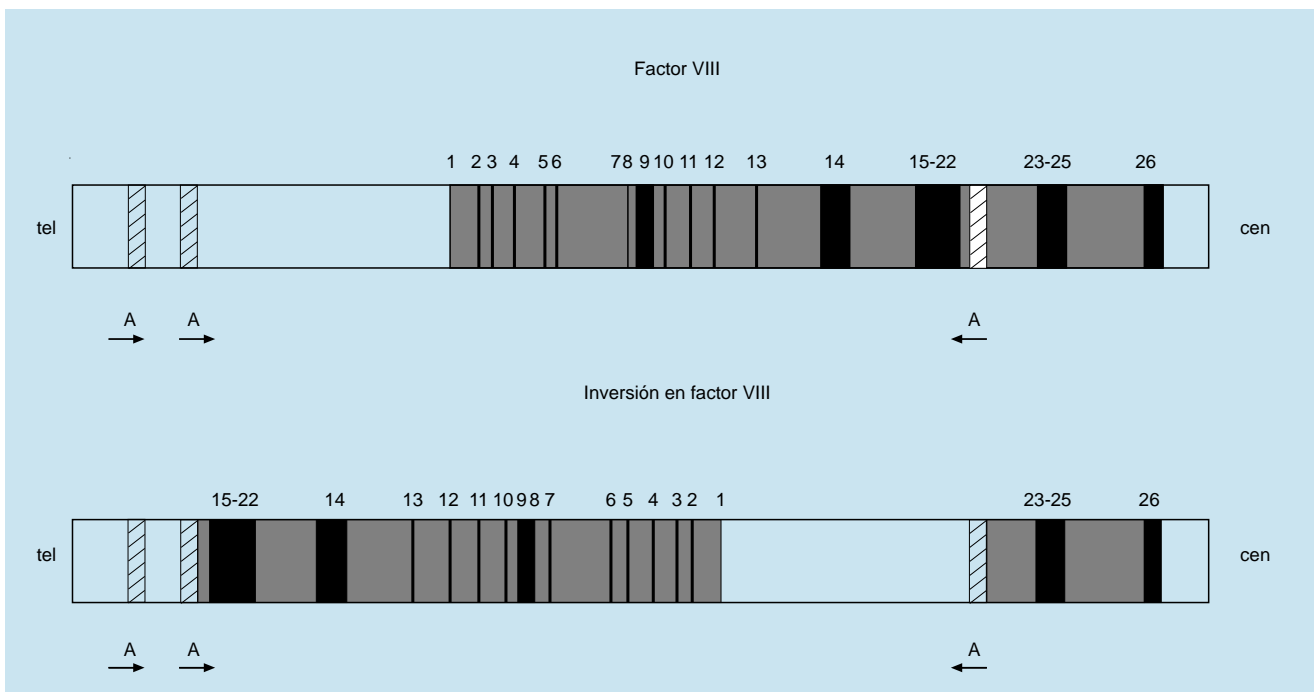
### Hemofilia B

La hemofilia B es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X en la que se producen hemorragias debido al déficit

del factor IX de la coagulación, que afecta a uno de cada 30.000 varones. Es una enfermedad muy heterogénea a nivel molecular. Aproximadamente el 50% de los pacientes con hemofilia B desarrollan anticuerpos específicos contra el factor IX. Estos pacientes tienen la particularidad de expresar el gen normalmente, aunque la actividad del factor IX se encuentra muy reducida o es inexistente. Los defectos moleculares del gen del factor IX incluyen las deleciones (10%) y una amplia gama de mutaciones puntuales (90%). La mayoría de las deleciones se han encontrado en los pacientes que tienen anticuerpos y muchas de ellas están situadas en los exones VII y VIII. Alrededor de la mitad de las mutaciones descritas se han detectado sólo en una ocasión, mientras que la otra mitad se presentan en 19 lugares recurrentes. Los datos sobre la actividad coagulante y los niveles de antígenos del factor IX permiten determinar las mutaciones presentes en cada paciente, ya sean defectos puntuales o deleciones en el seno del gen.

### Trombofilia

Las trombosis venosas profundas son una afección muy frecuente en la que influyen factores de riesgo, como la intervención quirúrgica reciente, la inmovilización, el embarazo o el déficit de alguno de los principales inhibidores de la coagulación, proteína C, proteína S y antitrombina III. La proteína C es una serinproteasa con afinidades por los factores VII, IX y X, que actúa como anticoagulante al destruir los factores V y VIII. Las alteraciones en un cofactor de la proteína C, de la proteína S o de la proteína C producen predisposición al tromboembolismo venoso. En el 20% de los individuos con tromboembolismo antes de los 45 años de edad, éste se debe a déficit de proteína C, S o antitrombina III, existiendo historia familiar de tromboembolismo. En el 80% de los pacientes con trombofilia estas proteínas no presentan alteración alguna. Recientemente se ha descubierto un nuevo cofactor activador de la proteína C, el cual se encuentra alterado en más del 20% de los casos con trombofilia. Los estu-



**Fig. 9.27.** Esquema de la región genómica del gen del factor VIII de la coagulación (en sombreado). Las barras verticales en negro corresponden a los exones (números 1 a 26) del gen del factor VIII. El trazado vertical rayado corresponde a los genes A, situados en el intrón 22 y en la región 5' del gen del factor VIII. Las flechas indican el sentido de transcripción de los genes A. Las mutaciones que originan la inversión del factor VIII se producen por recombinación entre las secuencias de los genes A, resultando en alteraciones estructurales como la mostrada en la figura. cen: centrómero; tel: telómero.

dios moleculares que definen las mutaciones en los genes codificantes para estas proteínas proporcionan información relevante sobre el papel de sus distintos dominios, a la vez que permiten la prevención adecuada de la trombofilia en la población.

## Fenilcetonuria

La fenilcetonuria y las hiperfenilalaninemias son procesos autosómicos recesivos, debidos a mutaciones en el gen codificante para la enzima hepática fenilalanina-hidroxilasa (PAH), que afectan a uno de cada 10.000 individuos de raza blanca. La enfermedad se puede detectar ya desde el nacimiento al observar concentraciones elevadas de ácido fenilpirúvico en la orina o valores elevados de fenilalanina en el suero. La detección tras el nacimiento mediante la prueba de Guthrie permite tratar a los niños afectados con una dieta pobre en fenilalanina, impidiendo el desarrollo de las lesiones neurológicas, características de la enfermedad.

El gen PAH se encuentra en la región q22-24 del cromosoma 12 y comprende 96 kb de DNA genómico, con 13 exones que suponen un mRNA de 2,4 kb. Hasta el momento se han identificado más de 50 mutaciones distintas en el gen PAH, la mayoría en el exón 7 (fig. 9.28). Varias de estas mutaciones se han detectado en dinucleótidos CpG. En algunos casos se han detectado mutaciones de tipo recurrente en poblaciones distintas. La frecuencia y la distribución de muchas de estas mutaciones se han estudiado en varias poblaciones. Estas mutaciones se encuentran asociadas a haplotipos determinados. En el este de Europa la mayoría de los cromosomas mutados con haplotipo 2 tienen la mutación R408W, mientras que en el norte y oeste de Europa la misma mutación se encuentra asociada al haplotipo 1. Los estudios

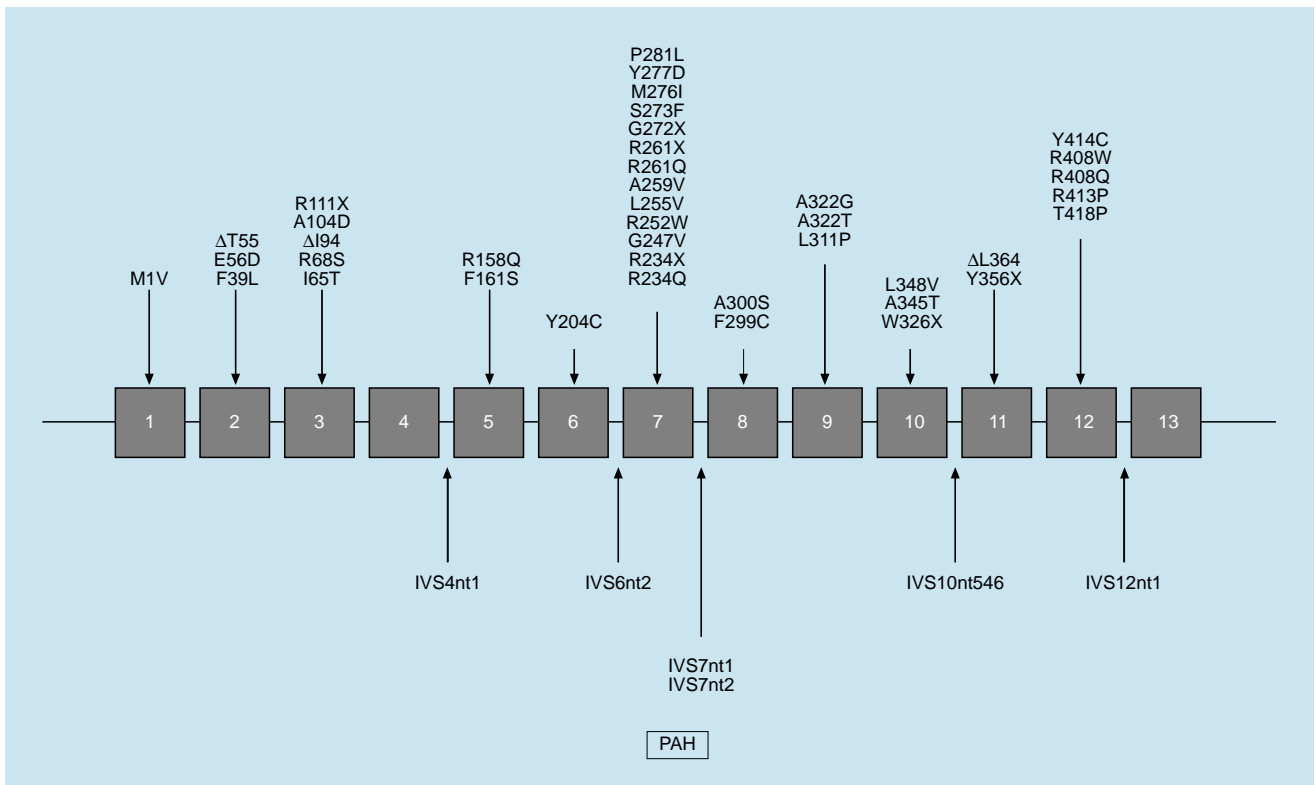
de mutaciones han permitido determinar las frecuencias de los distintos alelos en cada población, con heterogeneidad en algunas poblaciones y homogeneidad en otras.

Los estudios *in vitro* han confirmado la heterogeneidad fenotípica observada en la fenilcetonuria, reflejando la heterogeneidad alélica. La determinación genotípica en los pacientes tiene gran relevancia para evaluar su afectación fenotípica en las pruebas de detección neonatal, mejorando el diagnóstico clínico, el tratamiento y el pronóstico. El diagnóstico prenatal de fenilcetonuria sólo es posible mediante la detección directa de las mutaciones responsables o la utilización de marcadores polimórficos. Por otra parte, los métodos bioquímicos no permiten la identificación de los portadores asintomáticos de la enfermedad en la población general.

## Colagenopatías

Los genes del colágeno tienen una patología molecular compleja. Diversas alteraciones en un mismo gen pueden producir procesos patológicos clínicamente distintos, lo que se conoce como heterogeneidad alélica. Por otra parte, una misma enfermedad puede estar causada por la alteración molecular de distintos genes; es decir, existe heterogeneidad genética.

El colágeno es la proteína estructural más abundante en el organismo, y está presente en más del 60% de los tejidos, como huesos o cartílagos. La estructura global del colágeno es una triple hélice formada por tres cadenas polipeptídicas. La familia de los genes del colágeno está formada por más de 18 genes distintos. La molécula del colágeno puede tener todas las subunidades iguales, como en el caso de los tipos II y III, estar compuesta sólo por  $\alpha_1$ , como en los tipos II (cartíla-



**Fig. 9.28.** Representación del gen de la fenilalanina-hidroxilasa (PAH). Los recuadros sombreados representan los distintos exones (números 1 a 13). Las principales mutaciones se indican mediante flechas. Las letras señalan el aminoácido, y los números señalan el codón en el que se produce el cambio. IVS: intrones; nt: nucleótido.

**TABLA 9.7.** Genes del colágeno y enfermedades asociadas

Gen	Localización	Proteína	Enfermedad	Herencia
COL1A1	17q21.3-q22	pro $\alpha$ 1(I)	Ol tipo I Ol tipo II ED tipo VIIA1	Dominante Dominante Dominante
COL1A2	7q21.3-q22.1	pro $\alpha$ 2(I)	Ol tipo III Ol tipo IV ED tipo VIIA2	Recesiva Dominante Dominante
COL2A1	12q14.3	pro $\alpha$ 1(II)	Condrodisplasia Kniest/Stickler	Dominante
COL3A1	2q31-q32.3	pro $\alpha$ 1(III)	ED tipo IV	Dominante Recesiva
COL4A1	13q34	pro $\alpha$ 1(IV)		
COL4A2	13q34	pro $\alpha$ 2(IV)		
COL4A3	2q36	pro $\alpha$ 3(IV)	SA	Recesiva
COL4A4	2q36	pro $\alpha$ 4(IV)	SA	Recesiva
COL4A5	Xq22	pro $\alpha$ 5(IV)	SA	Dominante
COL4A6	Xq22	pro $\alpha$ 6(IV)	SA	Dominante
COL5A2	2q14-q32	pro $\alpha$ 2(V)		
COL6A1	21q22.3	pro $\alpha$ 1(VI)		
COL6A2	21q22.3	pro $\alpha$ 2(VI)		
COL6A3	2q37	pro $\alpha$ 3(VI)		
COL7A1	3p21	pro $\alpha$ 1(VII)	EA	Recesiva Dominante
COL9A1	6q12-q14	pro $\alpha$ 1(IX)		
COL11A1	1p21	pro $\alpha$ 1(XI)		
COL11A2	6p21.3	pro $\alpha$ 2(XI)		
COL13A1		pro $\alpha$ 1(XIII)		

Ol: osteogénesis imperfecta; ED: Ehlers-Danlos; EA: epidermolísis ampollar; SA: síndrome de Alport.

go y vítreo) o III (piel, arterias, útero e intestino), o estar formada por subunidades distintas, como en el colágeno de tipo I, compuesto por dos subunidades  $\alpha_1$  y una subunidad  $\alpha_2$  (hueso, tendón y piel). Los genes del colágeno descritos hasta el momento se encuentran localizados en ocho cromosomas distintos (tabla 9.7). Cada uno de los genes del colágeno está formado por unos 50 exones.

Los principales procesos debidos a alteraciones de los genes del colágeno son la osteogénesis imperfecta y el síndrome de Ehlers-Danlos.

### Osteogénesis imperfecta

La osteogénesis imperfecta afecta a uno de cada 10.000 nacimientos. Se caracteriza por fragilidad ósea, escleróticas azules, dientes decolorados y sordera debida a otosclerosis. Existe gran variabilidad clínica, siendo la forma más moderada de transmisión autosómica dominante, mientras que las formas más graves son autosómicas recesivas. Se han identificado varias mutaciones en el gen COL1A1, que provocan un cuadro de osteogénesis imperfecta muy grave, mientras que deleciones de varios nucleótidos se asocian a diversos tipos de gravedad clínica, dependiendo del lugar en el que se produce la deleción y de si ésta altera el molde de lectura de la cadena. Las mutaciones en el gen del COL1A2 producen un cuadro de osteogénesis imperfecta de menor gravedad. Tanto las mutaciones en el gen COL1A1 como las del COL1A2 ocasionan cuadros de osteogénesis imperfecta autosómica dominante, aunque algunas mutaciones en el gen del COL1A2 se transmiten de forma autosómica recesiva.

### Síndrome de Ehlers-Danlos

El síndrome de Ehlers-Danlos tiene una incidencia de uno de cada 150.000 nacimientos y se caracteriza por hiperelasticidad de la piel, laxitud articular, fragilidad vascular y cierta dificultad en la cicatrización de las heridas. El defecto se transmite de forma autosómica dominante, recesiva o ligada al sexo. Existen varias mutaciones en los genes del COL1A1, COL1A2 y COL3A1 que dan origen al síndrome. Las que se lo-

calizan en los genes COL1A1 y COL1A2 ocasionan cuadros dominantes, mientras que las que se producen en el gen COL3A1 pueden ser dominantes o recesivas. Para otras enfermedades del colágeno aún no se ha definido la patología molecular.

## Síndrome de Marfan

El síndrome de Marfan es de transmisión autosómica dominante, con un 20% de los casos debidos a mutaciones *de novo*. Durante los últimos años se ha progresado enormemente en el síndrome de Marfan, identificando el gen principal en el cromosoma 15 (FIB15), el cual codifica para una glucoproteína denominada *fibrilina*. El gen FIB15 codifica para un mRNA de más de 9 kb y está organizado en unos 65 exones. Se han detectado varias mutaciones en el gen FIB15 en pacientes con síndrome de Marfan, aunque las dificultades en su análisis estriban en la complejidad del gen. Se han descrito otras dos fibrilinas en los cromosomas 2 y 5, habiéndose detectado alteraciones en pacientes que presentan aracnodactilia contractural. La información que debe proporcionar el mejor conocimiento de las bases moleculares, celulares y bioquímicas del síndrome de Marfan deberá facilitar las bases para un mejor tratamiento y para la prevención eficaz del proceso.

## Hipercolesterolemia familiar

La hipercolesterolemia familiar es la enfermedad autosómica dominante más frecuente, con una incidencia de uno de cada 500 individuos, y afecta al 5% de los pacientes que sufren infarto de miocardio antes de los 60 años. Los pacientes heterocigotos padecen lesiones ateromatosas y alteraciones cardiovasculares, mientras que en los homocigotos la sintomatología es mucho más grave, pudiendo causar la muerte por infarto de miocardio en la infancia. La enfermedad se debe a mutaciones en el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), que provocan concentraciones elevadas de colesterol y de LDL en suero.

La secuencia de aminoácidos del receptor LDL está formada por 839 residuos que dan lugar a cinco dominios o regiones con funciones específicas. Se ha podido establecer una correlación entre los defectos moleculares y las distintas formas fenotípicas de la enfermedad. Fenotípicamente, en los fibroblastos de los pacientes afectados pueden distinguirse cuatro clases de hipercolesterolemia: clase I, en la que hay ausencia de proteína; clase II, defectos en el transporte de la proteína; clase III, alteración en la unión con las LDL, y clase IV, incapacidad para internarse en las vesículas tras la fijación del LDL.

El gen que codifica para el receptor LDL consta de 18 exones que abarcan un total de 45 kb en la región p13 del cromosoma 19. Se han descrito más de 50 mutaciones en el gen del receptor LDL. La mayoría de las familias tienen mutaciones específicas, que no se detectan en otras. En el gen LDL-R existe una elevada abundancia de secuencias repetitivas. Estas secuencias se denominan *Alu*, de las que existen más de 500.000 copias en el genoma. Varias de las deleciones que se han encontrado se deben a recombinaciones en el seno de las secuencias *Alu*. La clase I (50% de los casos) se debe a mutaciones que causan la ausencia de proteína, de las que se han descrito más de 20. La clase II (38%) corresponde a distintos tipos de mutaciones, que incluyen deleciones de pocas bases o mutaciones puntuales. Deleciones o inserciones de varias bases en los exones 2 a 8 son responsables de la clase III. La clase IV se debe tanto a mutaciones puntuales como a deleciones en el extremo 3' del gen

(exón 17), correspondientes al dominio citoplasmático de la proteína.

El diagnóstico de hipercolesterolemia familiar se establece mediante la determinación de colesterol plasmático y de las LDL, pero debe estudiarse genotípicamente a nivel molecular. El estudio de las distintas mutaciones que causan hipercolesterolemia familiar ha proporcionado importantes conocimientos sobre la estructura, los dominios y las interacciones del receptor de LDL y permite desarrollar las bases para la corrección génica.

## Déficit de $\alpha_1$ -antitripsina

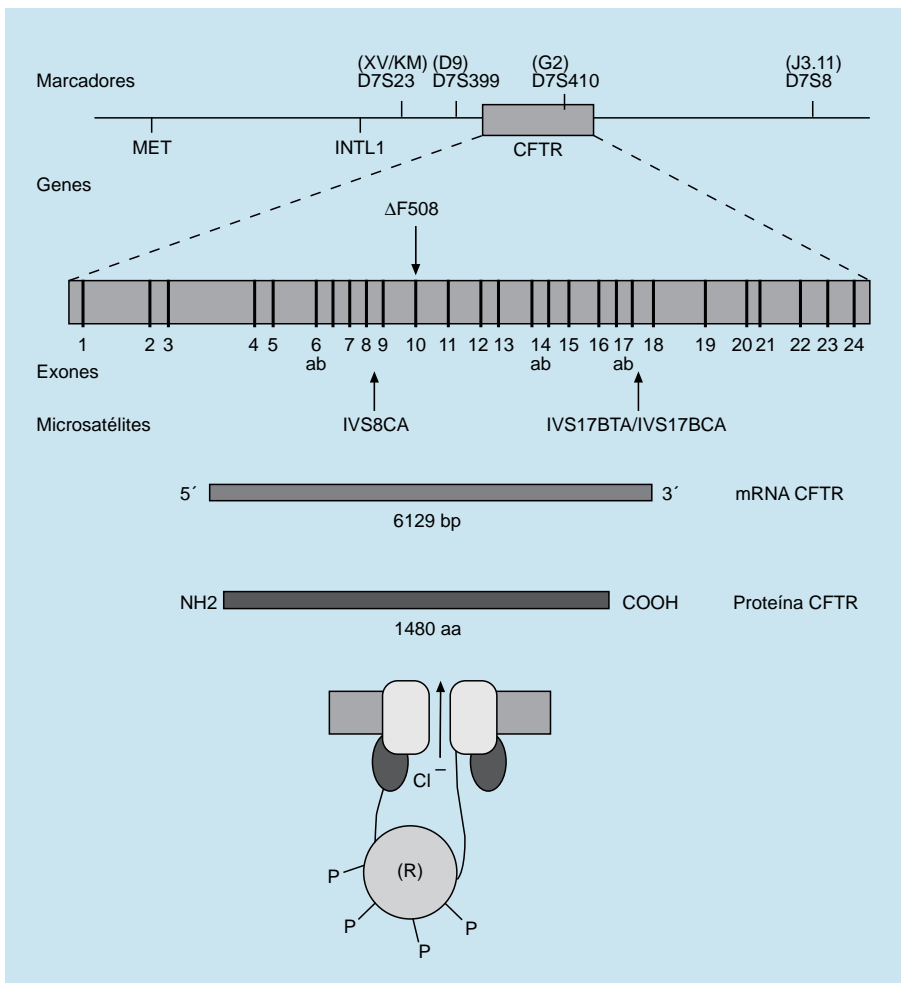
El gen de la  $\alpha_1$ -antitripsina está formado por tres exones no codificantes y tres exones que codifican para una proteína de 394 aminoácidos. El gen está situado en la región q31-32.3 del cromosoma 14. La proteína consiste en un inhibidor de la elastasa de los neutrófilos, enzima capaz de destruir la mayoría de los componentes de la matriz extracelular. El principal lugar de expresión del gen es el hígado, aunque también puede estar expresado en pulmón, riñón e intestino. La alteración clínica más frecuentemente asociada a déficit de  $\alpha_1$ -antitripsina es el enfisema pulmonar con deterioro progresivo de la función pulmonar. La enfermedad hepática puede encontrarse también asociada a déficit de  $\alpha_1$ -antitripsina, produciéndose cirrosis e insuficiencia hepática.

Se han identificado más de 75 alelos en el gen  $\alpha_1$ -antitripsina. Las principales mutaciones que ocasionan déficit de  $\alpha_1$ -antitripsina son la mutación Z y la S. La mutación Z consis-

te en una sustitución en el exón V del gen, dando un cambio de ácido glutámico a lisina en el codón 342. La frecuencia alélica de esta mutación es de 1-2% en la población caucásica. La mutación S es el resultado de una sustitución de ácido glutámico por valina en el codón 264 del exón III. Esta mutación tiene una frecuencia del 2-4% en los europeos. La mutación Z es más grave que la S en relación con el riesgo al desarrollo de enfisema pulmonar. Otras mutaciones que se han descrito, asociadas al déficit de  $\alpha_1$ -antitripsina, son también responsables del desarrollo de enfisema.

## Fibrosis quística

El gen de la fibrosis quística o mucoviscidosis ha sido el primer gen humano aislado sin conocer la proteína para la que codifica, ni disponer de claves citogenéticas que permitiesen un avance rápido en su identificación. Es la enfermedad hereditaria autosómica recesiva grave más frecuente en la raza blanca. Tiene una incidencia aproximada de uno por cada 2.500 recién nacidos y una frecuencia de portadores de uno por cada 25. La fibrosis quística es una enfermedad de las células epiteliales exocrinas. Los pacientes producen un moco espeso y viscoso que obstruye los conductos del órgano donde se localiza. Aunque la enfermedad afecta la mayoría de los órganos, el páncreas y los pulmones son los más dañados, siendo la insuficiencia pancreática y la enfermedad pulmonar las que determinan la gravedad del proceso, así como su pronóstico y mortalidad. En la actualidad, gracias al diagnóstico precoz, la antibioticoterapia y la medicina



**Fig. 9.29.** Mapa del gen de la fibrosis quística con representación de sus exones (barras verticales), la mutación principal ( $\Delta F508$ ), los marcadores polimórficos, microsatélites y otros clones clave en el análisis del gen CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene), el mRNA (trazado sombreado claro), la proteína CFTR (trazado sombreado oscuro) y representación de la estructura CFTR con los distintos dominios (transmembránico), unión al ATP y regulador (con unión de grupos fosfato, P).

preventiva, la mayoría de los pacientes sobreviven a la infancia con una esperanza de vida media, en centros especializados, superior a los 30 años.

Los estudios fisiopatológicos han demostrado que el defecto se localiza en la regulación del transporte iónico de las células epiteliales exocrinas. La concentración de electrolitos en el sudor está altamente elevada, por lo que su determinación constituye una importante prueba diagnóstica.

El método que condujo a la identificación de la región cromosómica que se encuentra mutada en la fibrosis quística se basa en los estudios de ligamiento genético y son el resultado del trabajo de 5 años analizando familias con más de un hijo afecto, utilizando marcadores del DNA. Los primeros datos de ligamiento para la fibrosis quística se obtuvieron en 1985 en el brazo largo del cromosoma 7, entre los marcadores MET y J3.11, a una distancia genética menor de 1 centimorgan (cM). Sin deleciones que facilitasen la tarea de la localización fina del gen de la fibrosis quística, tuvieron que desarrollarse técnicas moleculares de cartografía física, como la electroforesis en geles de campos de pulsantes (PFGE), que permitieron el estudio detallado de esta región cromosómica, y determinan el orden de *loci* en relación con la fibrosis quística: MET-INT1L1-D7S23-D7S399-FQ-D7S410-D7S8. Los marcadores desarrollados pusieron de manifiesto una intensa asociación alélica o desequilibrio de ligamiento, indicativo de una elevada homogeneidad del defecto molecular, de forma que una sola mutación es responsable de aproximadamente el 80% de los casos de la enfermedad y que los marcadores están muy cerca del gen responsable. Estos marcadores permitieron limitar la región en la que se encuentra el gen de la fibrosis quística a menos de 300 kb, entre MP6d-9 y G-2. El análisis con secuencias derivadas de esta región cromosómica permitió aislar un cDNA de 6.129 pb, a partir de una genoteca de células epiteliales. Este cDNA se extiende en una región genómica de unos 250 kb que consta de 27 exones. La secuencia de aminoácidos para la que este gen codifica supone una proteína de 1.480 aminoácidos (fig. 9.29).

La función de la proteína CFTR (regulador transmembrana de la fibrosis quística) es la de un canal del cloro regulador del transporte iónico a través de la membrana apical de las células epiteliales. El análisis del gen normal y del gen de la fibrosis quística mutado ha permitido observar una mutación muy frecuente, que consiste en la pérdida de tres bases en el codón 508 (mutación  $\Delta F508$ ), que ocasiona la pérdida de una fenilalanina. Esta deleción se produce en una región de la proteína de unión al ATP. Alrededor del 70% de los cromosomas de la fibrosis quística de la población del norte de Europa y América tienen esta deleción, mientras que en el Mediterráneo y en la población española esta mutación sólo representa el 50% de los casos, lo que sugiere y confirma una mayor heterogeneidad para la enfermedad en la población del sur de Europa (tabla 9.8). Se han identificado más de 400 mutaciones en el gen CFTR, aunque existen pocas que tengan una frecuencia elevada en el conjunto de la población mundial. Las cinco mutaciones más frecuentes son:  $\Delta F508$ , G542X, G551D, N1303K y W1282X. En poblaciones específicas la distribución es distinta, como es el caso de la población española en la que unas 50 mutaciones cubren sólo el 80% de los cromosomas de la fibrosis quística, estimándose en más de un centenar el total de mutaciones de la población (tabla 9.9). Estos datos contrastan con los obtenidos en poblaciones como la británica, el norte de Francia o la belga, en las que una decena de mutaciones cubre más del 95% de los cromosomas de la fibrosis quística. El estudio de estas mutaciones que afectan puntos clave de la proteína CFTR proporciona información sobre su función y sobre la fisiopatología de la enfermedad. Esta información permitirá un mejor planteamiento terapéutico para los pacientes, a la vez que abrirá las puertas a la terapia génica, de la que ya existen diversos protocolos clínicos en varios países con esta finalidad.

Durante los últimos años se ha intentado correlacionar las mutaciones que presentan los pacientes con fibrosis quística

**TABLA 9.8.** Distribución de las mutaciones de la fibrosis quística en distintas poblaciones

	$\Delta F508$ (%)	no- $\Delta F508$ (%)
Dinamarca	85	15
Reino Unido/Irlanda	75	25
Norteamérica	72	28
Alemania	70	30
Francia	70	30
España	50	50
Italia	48	52
Finlandia	45	55
Grecia	40	60
Turquía	30	70
Israel	20	80

**TABLA 9.9.** Principales mutaciones de la fibrosis quística en población mundial y española

Población mundial		Población española	
Mutación	Porcentaje	Mutación	Porcentaje
$\Delta F508$	68,3	$\Delta F508$	50,6
G542X	2,4	G542X	8,0
G551D	1,7	N1303K	2,4
N1303K	1,2	1811 + 1.6 kb → G	1,9
W1282X	1,1	R1162X	1,8
621 + 1G → T	0,7	711 + 1G → T	1,2
1717-1G → A	0,6	R334W	1,1
R553X	0,7	712-1G → T	1,0
Otras mutaciones	4,0	Otras mutaciones	12,0
Mutaciones desconocidas	19,3	Mutaciones desconocidas	20,0
Total	100,0	Total	100,0

con las alteraciones clínicas. Existen algunas mutaciones del tipo *missense*, en las que cambia un aminoácido, las cuales se encuentran principalmente asociadas a pacientes con función pancreática normal. La determinación del genotipo específico en cada paciente tiene especial importancia en cuanto al pronóstico de la enfermedad, sobre todo cuando la enfermedad se diagnostica en la edad adulta. El gen de la fibrosis quística presenta también mutaciones en pacientes con esterilidad debida a agenesia bilateral de vasos deferentes, sin sintomatología clínica de la enfermedad. Las mutaciones que presentan estos pacientes son benignas, y no producen lesiones pulmonares o digestivas.

## Poliquistosis renal del adulto

Aproximadamente el 10% de los casos de insuficiencia renal crónica se deben a poliquistosis renal de transmisión dominante. La enfermedad se manifiesta en la edad adulta y afecta a uno de cada 1.000 individuos. A pesar de que es posible detectar los quistes mediante ecografía, ésta no tiene suficiente sensibilidad diagnóstica, de forma que sólo el 65% de los casos de poliquistosis son diagnosticados antes de los 20 años, y alrededor del 5% no se detectan hasta después de los 30 años de edad. La enfermedad se caracteriza por la formación y el agrandamiento de quistes en los riñones y otros órganos. En el 10% de los pacientes se producen aneurismas cerebrales. En 1985 se describió ligamiento genético entre la poliquistosis renal dominante y marcadores localizados en la región cromosómica 16p13.3 (*locus* PKD1). Estos estudios demostraron que el 15% de las familias no estaban ligadas al cromosoma 16, sugiriendo heterogeneidad para la poliquistosis renal. Un estudio en las familias no segregantes con marcadores del cromosoma 16 ha permitido detectar el segundo *locus* (PKD2) en el cromosoma 4. El gen de la PKD1



ha sido aislado recientemente, encontrándose mutaciones en los pacientes con la enfermedad. El gen PKD2 no ha sido aislado todavía.

A pesar de que se han realizado diagnósticos prenatales de poliquistosis renal utilizando marcadores cercanos al gen, este tipo de estudios plantea también ciertos problemas éticos. En primer lugar, se trata de realizar el diagnóstico prenatal de una enfermedad que no se manifestará hasta la edad media de la vida y para la que sólo existe un tratamiento paliativo. Por otra parte, los pacientes pueden ser diagnosticados mucho antes de que lleguen a desarrollar la sintomatología de la enfermedad, sin disponer, de momento, de un tratamiento preventivo. Sin embargo, el avance en el conocimiento de la enfermedad reside en el aislamiento de los genes responsables y el desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas.

## Patología neuromuscular

### Distrofia muscular de Duchenne

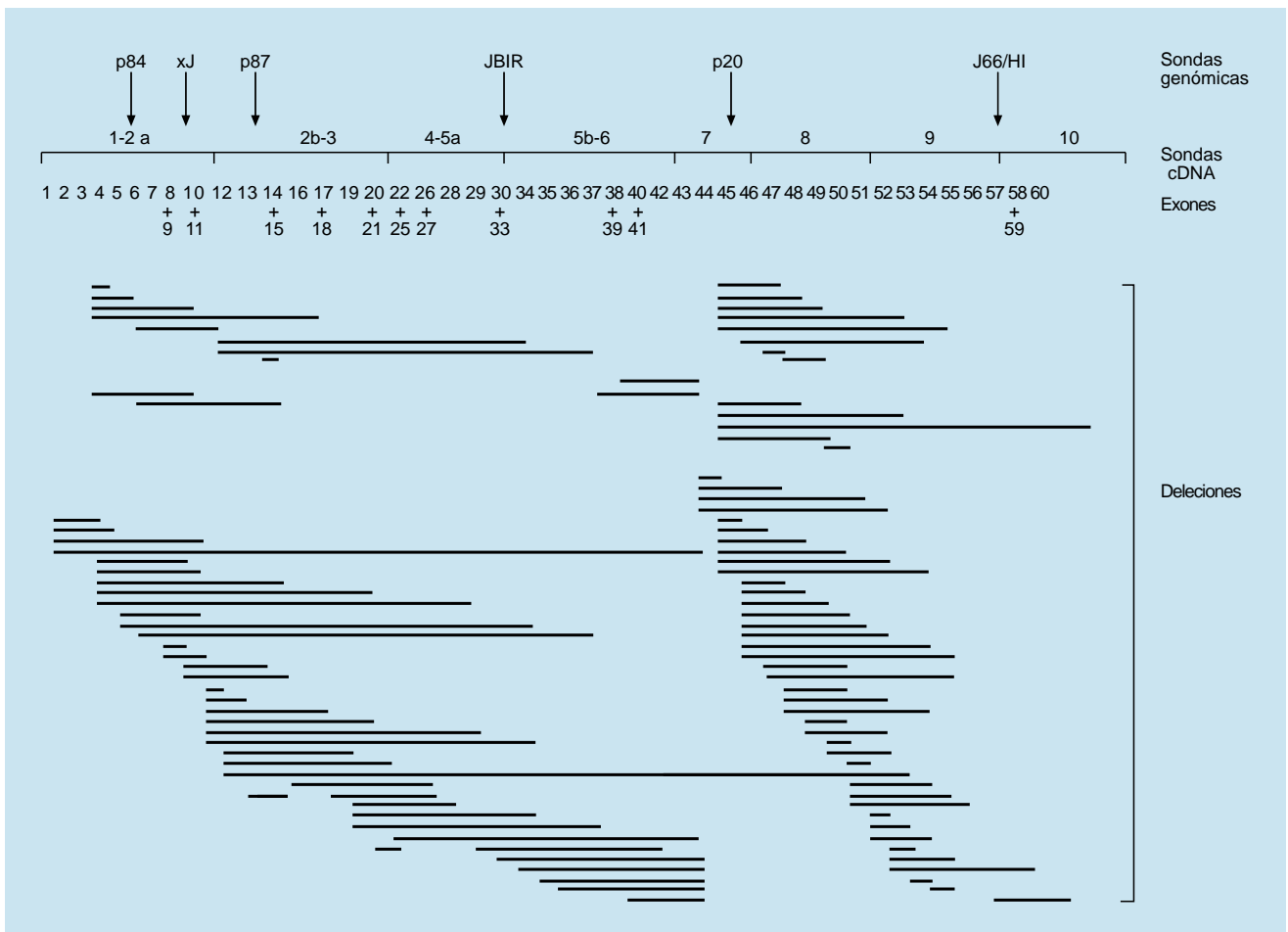
La genética inversa ha conducido a la identificación del gen alterado en la distrofia muscular de Duchenne y de Becker (DMD/DMB). Esta enfermedad es una de las más frecuentes de las recesivas ligadas al cromosoma X (1/3.500). La vida de los varones afectados se ve limitada a la silla de ruedas, y la mayoría no sobrevive después de los 20 años. El pronóstico

de la DMB es algo mejor. A principios de la década de los ochenta el conocimiento sobre la DMD se limitaba al cuadro clínico y a la localización del gen en el cromosoma X, debido al patrón de transmisión que presenta. Los niveles elevados de creatinincasa en suero permitían el diagnóstico a partir del período neonatal, pero el diagnóstico prenatal era totalmente imposible.

La clave inicial sobre la localización precisa en el cromosoma X del gen responsable de la enfermedad se debió a la observación de translocaciones entre autosomas y el cromosoma X, en las que la región Xp21 se encontraba siempre implicada. La localización del gen en esta región cromosómica fue también sugerida por los estudios de ligamiento genético con RFLP que detectan *loci* situados a ambos lados de la región Xp21. Estos marcadores permitieron su utilización para el diagnóstico prenatal y la detección de portadores de la enfermedad. El enriquecimiento en clones de la región del gen de la DMD permitió identificar un mRNA de 14 kb, correspondiente al gen de la enfermedad, y aislar el DNA complementario (cDNA) a partir de mRNA de células musculares.

El gen de la DMD cubre una región genómica de 2,5 Mb (2.500.000 pb). Dicho gen es el más grande que se ha identificado, el cual es 1.000 veces más grande que los genes de la globina, y más de 70 veces mayor que el gen del factor VIII y contiene más de 79 exones. El elevado tamaño de este gen justifica, en parte, la alta frecuencia de casos debidos a mutación espontánea (fig. 9.30).

La proteína para la que el gen de la DMD codifica se ha denominado distrofina –debido a que su ausencia o defecto causa distrofia– y contiene 3.685 aminoácidos. Los estudios de expresión del gen de la DMD y del producto proteico



**Fig. 9.30.** Localización de las deleciones en el seno del gen de la distrofia muscular de Duchenne. La mayoría de las deleciones se corresponden a las regiones reconocidas por las sondas genómicas XJ y P20. (Modificada de KOENIG M et al. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 498-506.)

muestran que muchos pacientes con dicha enfermedad no producen la proteína en sus músculos, mientras que los pacientes con DMB producen una proteína más corta, que realiza parte de su función. El análisis de la estructura primaria de la cadena proteica de la distrofina ha puesto en evidencia su estructura fibrilar. Existen cuatro dominios: uno parecido al de la  $\alpha$ -actinina, un segundo dominio muy similar al de la cadena  $\alpha$  de la espectrina, un tercer dominio parecido al de la  $\alpha$ -actina y un dominio que sirve para unirse a la membrana celular. A pesar de que la función y la fisiología de esta proteína aún no se conocen bien, pertenece a la familia de las proteínas del citoesqueleto.

Alrededor del 65% de los pacientes con DMD tienen deleciones en el seno del gen para dicha enfermedad. Esta elevada incidencia de deleciones es sorprendente si se compara con otras regiones del cromosoma X, en las que las deleciones sólo suponen el 10%. De este modo, parece que en la región Xp21 existen secuencias que favorecen las deleciones, lo cual se ha podido evidenciar al encontrarlas en regiones específicas del gen de la DMD, a nivel del marcador P20 y de la sonda XJ. Estas dos zonas son consideradas *hot spots* de recombinación (fig. 9.30). El tamaño de las deleciones comprende desde unas pocas kilobases a más de 2.000 kb. El empleo de las sondas derivadas del cDNA o sistema de PCR múltiple permiten poner en evidencia fácilmente las deleciones del gen. En el 5% de los casos se presentan duplicaciones. El análisis detallado de los casos en los que no se ha encontrado ninguna deleción ha permitido identificar mutaciones puntuales que consisten en cambios de aminoácidos o mutaciones que originan una proteína truncada.

El diagnóstico prenatal genotípico de DMD/DMB se basa en la detección directa de la deleción, cuando ésta se halla presente, o en el diagnóstico indirecto proporcionado por la segregación de marcadores en la familia. El análisis con microsatélites de las zonas más frecuentemente delecionadas permite poner en evidencia con mayor rapidez el defecto molecular en cada familia.

En los casos esporádicos debe tenerse en cuenta la posibilidad de que se trate de una mutación *de novo*, que puede presentarse en alrededor del 30% de los casos. El diagnóstico de tales mutaciones reviste especial importancia ya que evita someter a la madre a un diagnóstico prenatal innecesario y excluye al resto de las mujeres de la familia de ser portadoras de la mutación. Existe la posibilidad de que una madre transmita a varios de sus hijos una deleción, pero que ella no posea tal defecto en sus células somáticas. Este fenómeno constituye lo que se conoce como *mosaicism* y se debe a un error mitótico en la formación de las células precursoras de los gametos.

## Distrofia miotónica

La distrofia miotónica de Steinert es la enfermedad neuromuscular no ligada al sexo más frecuente, con una incidencia de uno en 8.000. Es un proceso que se manifiesta principalmente en la edad adulta, aunque la primera sintomatología se presenta antes de los 20 años. La enfermedad afecta tanto el músculo estriado como otros tejidos y se transmite de forma autosómica dominante, aunque la expresividad clínica es muy variable. Además de la miotonía, los pacientes presentan debilidad y atrofia muscular progresiva, cataratas, alteraciones de la conducción cardíaca, atrofia testicular, calvicie frontal y, en los casos de inicio temprano, retraso mental. Existe una forma neonatal muy grave que se presenta en los hijos de una madre afectada.

Los primeros datos de ligamiento genético se encontraron con los grupos sanguíneos Lutheran y Lewis en 1951, pero no fue hasta 1982 cuando pudo localizarse el gen en el cromosoma 19 al encontrar ligamiento con el factor 3 del complemento, localizado en dicho cromosoma. Estudios posteriores con otros marcadores permitieron localizar el gen de la distrofia miotónica en la región 19q13.3, en situación distal al *locus*

de la apolipoproteína CII (APOCII). El análisis detallado de esta región cromosómica permitió la identificación del gen de la distrofia miotónica. Este codifica para una proteína inactiva. La mutación responsable de la distrofia miotónica es una secuencia repetitiva de tres bases (CTG) $_n$  que se encuentra en la región 3' del gen de la distrofia miotónica, la cual produce una alteración en la regulación de la expresión del gen. La secuencia (CTG) $_n$  es variable en los individuos normales, pero se encuentra anormalmente expandida en los pacientes con distrofia miotónica. La expansión varía entre 0,2 y 13 kb, detectando las expansiones de mayor tamaño en los casos congénitos. El tamaño de la expansión se correlaciona con la gravedad clínica de los pacientes, aunque no es posible realizar un diagnóstico predictivo de la enfermedad sólo sobre la base de la longitud de las repeticiones encontradas. La distrofia miotónica es una de las enfermedades neurológicas en las que se producen las denominadas *mutaciones dinámicas*, juntamente con el retraso mental ligado al cromosoma X frágil, la ataxia espinobulbar, la corea de Huntington y la ataxia espinocerebelosa tipo 1.

## Neuropatía sensorial y motora desmielinizante hereditaria

### Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth

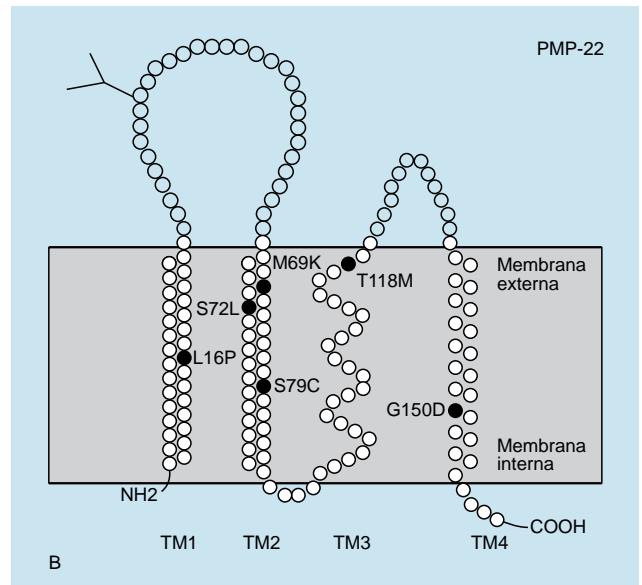
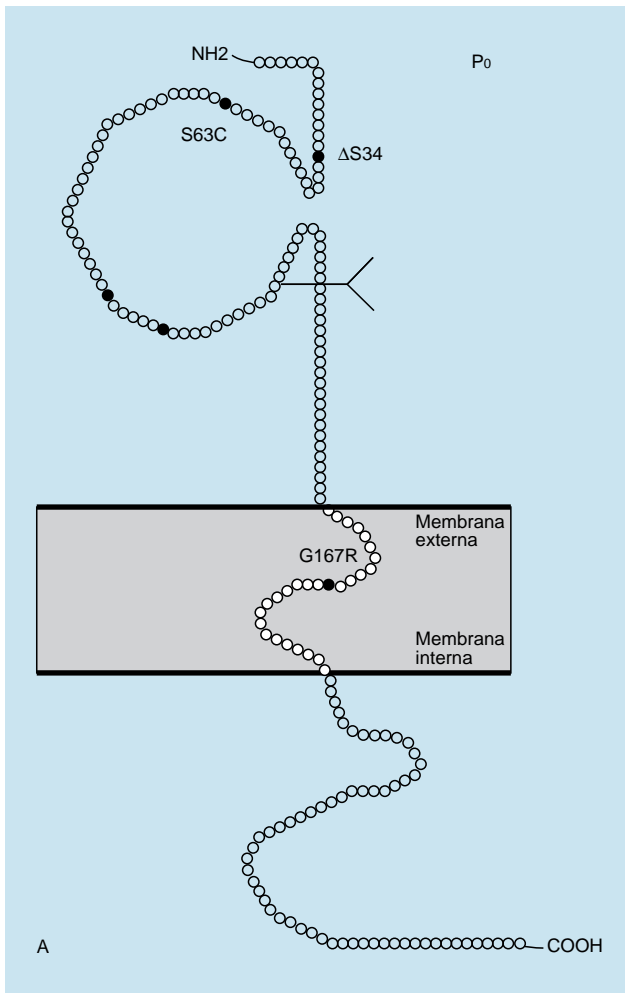
La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 1 es la neuropatía sensorial y motora hereditaria más frecuente. Se caracteriza por atrofia y debilidad musculares distales simétricas. La velocidad de conducción nerviosa sensorial y motora se encuentra reducida ( $< 38$  m/seg) e histológicamente existe desmielinización e hipertrofia. El proceso se transmite de forma autosómica dominante con elevada penetrancia. La mayoría de las familias afectadas de enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 1 muestran ligamiento genético con marcadores localizados en el cromosoma 17, *locus* denominado CMT1A. En la mayoría de los pacientes con enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 1 se ha detectado una duplicación de unas 500 kb en la región 17p11.2. Esta duplicación implica el gen PMP-22 (proteína 22 de la mielina periférica) y en algunos casos se han detectado mutaciones puntuales que implican directamente al gen PMP-22 en la patogenia de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 1A.

La proteína  $P_0$ , o proteína de la mielina cero, es la principal proteína estructural de la mielina del sistema nervioso. La proteína  $P_0$  es una glucoproteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que desempeña un papel esencial en la compactación de la mielina. El gen codificante para  $P_0$  se ha localizado en el cromosoma 1q22-23, donde previamente se situó el segundo *locus* de CMT1 (CMT1B). El análisis de varias familias con CMT1B ha permitido detectar mutaciones en el dominio extracelular de  $P_0$ .

Existen familias con enfermedad de Charcot-Marie-Tooth ligada al cromosoma X, en las que se han encontrado mutaciones en el gen que codifica para la proteína conexina localizado en dicho cromosoma.

### Síndrome de Déjerine-Sottas

El síndrome de Déjerine-Sottas (neuropatía sensorial y motora hereditaria tipo III) es una neuropatía desmielinizante grave de inicio en la infancia o la adolescencia. La mayoría de los casos se han calificado de esporádicos, aunque presumiblemente son de transmisión autosómica recesiva. Los pacientes presentan velocidad de conducción nerviosa notablemente disminuida, desmielinización y remielinización de



**Fig. 9.31.** Modelos estructurales de las proteínas  $P_0$  (A) y PMP-22 (B) y representación de mutaciones responsables de síndrome de Déjerine-Sottas y enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, así como mutaciones en PMP-22 en el ratón. La parte sombreada del esquema corresponde a la región transmembránica. El lugar de glucosilación se señala con Y. Las letras corresponden a los aminoácidos y los números a las posiciones de los codones. NH2: extremo aminoterminal; COOH: extremo carboxiterminal.

los nervios periféricos. El cuadro clínico es similar al de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 1, pero con un inicio más temprano y una sintomatología más grave. Estudios realizados en pacientes con neuropatía sensorial y motora hereditaria tipo III han puesto de manifiesto mutaciones tanto en el gen  $P_0$  como en el PMP-22. Estos resultados reflejan que el síndrome de Déjerine-Sottas y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 1 son formas distintas de procesos clínicos relacionados debidos a heterogeneidad alélica en los genes  $P_0$  o PMP-22, demostrando que la identificación de los defectos moleculares de las enfermedades permite una clasificación de las neuropatías periféricas, desde el punto de vista etiológico, y progresar en el conocimiento del papel fisiológico de cada componente de la mielina (fig. 9.31).

## Patología neurodegenerativa

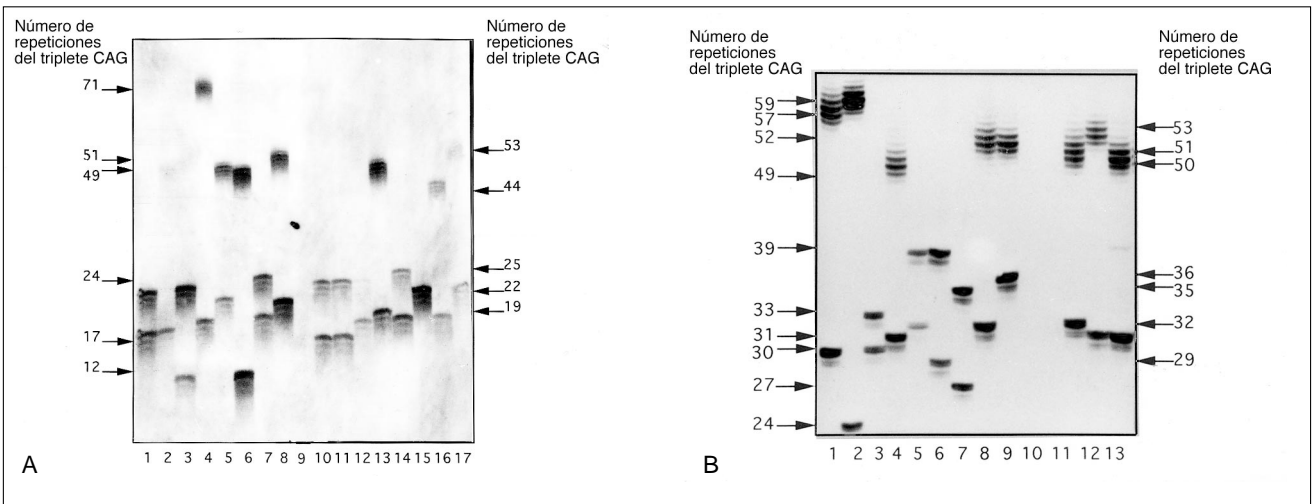
### Corea de Huntington

La corea de Huntington es una enfermedad neurodegenerativa que se inicia entre los 30 y 50 años de edad y se caracteriza por alteraciones neurológicas y psiquiátricas que evolucionan a la demencia. Existe una preponderancia de casos juveniles, derivados de la transmisión paterna de la enfermedad. Las alteraciones motoras se inician como movimientos involuntarios que se van haciendo cada vez más exagerados hasta incapacitar al paciente en un cuadro coreico. No existe

tratamiento efectivo ni posibilidad de prevenir la enfermedad, y la mayoría de los pacientes mueren antes de los 20 años de iniciarse el proceso. El patrón de herencia es dominante y la incidencia de la enfermedad es de uno de cada 10.000 individuos, afectando mayoritariamente a la raza blanca.

Los estudios de ligamiento genético entre RFLP y la enfermedad en familias con varios miembros afectados permitió localizar el gen de la corea de Huntington en el extremo terminal del cromosoma 4, ligado al marcador G8. El estudio genético y la aplicación de las tecnologías de clonación posicional permitieron la identificación del gen de la corea de Huntington 10 años después de su localización en el cromosoma 4. Dicho gen codifica para un transcrito de 10 kb que contiene el trinucleótido (CAG) $n$ , que es polimórfico en individuos normales (11 a 34 copias), mientras que se encuentra expandido en los pacientes con corea de Huntington (42 a 86 copias) (fig. 9.32). Los estudios realizados han demostrado que existe una relación inversa entre la longitud de la repetición y la edad de inicio de la enfermedad. Por otra parte, la secuencia repetitiva es inestable, produciéndose incrementos y decrementos de la longitud de las repeticiones durante la meiosis, siendo los cambios más notables durante la transmisión paterna. Estos estudios han puesto de manifiesto que en los casos sin antecedentes familiares (*de novo*) los pacientes afectados tienen expansiones por encima de las 42 repeticiones, mientras que sus familiares no afectados tienen expansiones entre los valores normales y los patológicos. Los estudios de expresión del gen de la corea de Huntington muestran que el mRNA se encuentra distribuido de forma muy uniforme en todas las neuronas del cerebro, aunque sin correlación específica con las alteraciones neuropatológicas





**Fig. 9.32.** Análisis del triplete (CAG)<sub>n</sub> del gen de la corea de Huntington (A) y del gen de la ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1) (B) en pacientes afectados y normales. Los números con las flechas, a ambos lados de la figura, indican el número de repeticiones del triplete CAG detectada para cada alelo. Los alelos mutados se corresponden a tripletes con más de 40 repeticiones.

detectadas en los pacientes con corea de Huntington. El patrón de herencia dominante sugiere que la mutación de la enfermedad causa una ganancia de función de la proteína, pudiendo producir una función nueva, nociva para el organismo, quizá con lesiones específicas para regiones neuronales determinadas, especialmente en las neuronas del núcleo estriado.

En las familias con corea de Huntington los hijos de un individuo afecto tiene un riesgo de 1/2 de heredar el gen mutado y de desarrollar la enfermedad. En la actualidad es posible realizar el diagnóstico presintomático y prenatal de la enfermedad de forma eficaz. Este tipo de análisis tiene importantes connotaciones éticas, ya que el individuo diagnóstico se encuentra sin sintomatología en el momento del estudio, con lo que éste representa una sentencia sobre su futuro, sin posibilidades terapéuticas en la actualidad.

### Ataxias hereditarias recesivas y dominantes

Las ataxias hereditarias constituyen un grupo heterogéneo de trastornos degenerativos del sistema neurológico. Las ataxias de herencia recesiva se centran en la ataxia de Friedreich y en la ataxia derivada del déficit de vitamina E. Las localizaciones cromosómicas de los genes responsables de estas enfermedades se han podido definir, situándose el gen de la ataxia de Friedreich en el cromosoma 9q13-21, y el del déficit de vitamina E en el brazo largo del cromosoma 8. Los genes de estos trastornos todavía no se han identificado, aunque los marcadores detectados permiten el diagnóstico indirecto de estos procesos, tanto prenatal como de portadores.

Las ataxias de transmisión dominante son un grupo heterogéneo clínico y genéticamente, con varios *loci* detectados en los cromosomas 6, 12 y 14, y varios otros *loci* todavía no identificados. Se caracterizan por degeneración del cerebelo con ataxia, disartria, amiotrofia y alteraciones extrapiramidales. El gen responsable de la ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1) se ha localizado en el cromosoma 6p y contiene una región repetitiva (CAG)<sub>n</sub>, que se encuentra expandida de forma anómala en los pacientes con la enfermedad. Los estudios realizados indican repeticiones entre 41 y 82, mientras que en los individuos normales existen entre 6 y 39 copias de la secuencia (CAG)<sub>n</sub> (fig. 9.32). De este modo, para SCA1 es posible el diagnóstico presintomático de forma adecuada. Otras ataxias dominantes, como es el caso de la enfermedad de Machado-Joseph, localizada en el cromosoma 14, o el *locus* SCA2 en el cromosoma 12, tienen anticipación clínica (es decir, presentación de la enfermedad en edades preco-

ces o bien mayor gravedad de la misma), sugiriendo que pueden ser debidas a mutaciones similares. Cabe esperar que los genes implicados en estos procesos puedan identificarse en los próximos años.

### Enfermedad de Alzheimer

Es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la presencia de placas seniles amiloides y neurofibrilares en el cerebro. El principal componente de la sustancia amiloide es Aβ, un péptido de 49-43 aminoácidos, derivado del precursor de la proteína amiloide (APP), codificada por un gen situado en el cromosoma 21. Una parte de los casos de enfermedad de Alzheimer es de tipo hereditaria, presentan heterogeneidad. Un *locus* implicado en casos de inicio temprano (< 65 años) se ha localizado en el cromosoma 21, con un 3% de las familias que sufren mutaciones en el gen APP. Recientemente se ha detectado un segundo *locus* implicado en la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano, localizado en el cromosoma 14. Por otra parte, algunas familias con inicio más tardío de la enfermedad (> 65 años) tienen ligamiento genético en el cromosoma 19. La identificación de genes homólogos con APP en estos cromosomas, a la vez que el estudio detallado de familias afectas y de las regiones cromosómicas específicas, permitirá avanzar en el conocimiento de esta enfermedad.

### Distrofias hereditarias de retina

La retinitis pigmentaria es un conjunto de alteraciones degenerativas hereditarias de la retina que tiene una incidencia global de uno de cada 3.500 individuos. Los estadios iniciales de la enfermedad se caracterizan por ceguera nocturna y pérdida del campo visual periférico. A medida que la enfermedad progresa se pierde el resto de la visión periférica y central, con ceguera completa. Las principales alteraciones oculares incluyen pigmentación intrarretiniana, en la periferia, con destrucción de los bastones, observándose electroretinogramas disminuidos. La retinitis pigmentaria puede heredarse de forma autosómica dominante, recesiva o recesiva ligada al sexo. Independientemente, cada una de estas formas hereditarias muestra heterogeneidad, con varios *loci* responsables del proceso.

El gen de la *rodopsina*, localizado en el cromosoma 3q, es responsable del 30% de los casos de retinitis pigmentaria de

herencia autosómica dominante. Este mismo gen es también responsable de algunos casos de herencia autosómica recesiva. Otro *locus* ha sido implicado en el cromosoma 6p, encontrando mutaciones en el gen de la *periferina* en familias con herencia autosómica dominante, pero también en casos de otras distrofias retinianas. Otros *loci* implicados en la retinitis pigmentaria se han localizado en los cromosomas 7 (dos *loci*) y 8, aunque los genes responsables no han sido identificados. Finalmente, en el cromosoma X se han detectado dos *loci* implicados en la retinitis pigmentaria, aunque ninguno ha sido caracterizado todavía. La identificación de los distintos genes implicados en la patología retiniana y su estudio molecular debe permitir una mejor comprensión de estos trastornos, a la vez que debe proporcionar las bases para el desarrollo de tratamientos adecuados, que pueden incluir la corrección genética.

## Enfermedad de Wilson

La enfermedad de Wilson es un proceso autosómico recesivo del transporte del cobre, en el que existe un defecto en la incorporación de cobre en ceruloplasmina en el hígado y en la excreción biliar. El resultado de esta alteración es la acumulación de forma tóxica de cobre en el hígado, el riñón, el cerebro y la córnea, produciendo cirrosis y lesiones neurológicas progresivas. El gen de la enfermedad de Wilson se localizó en el cromosoma 13q14.3 mediante ligamiento genético en familias con varios miembros afectados. El gen de la enfermedad de Wilson se ha aislado recientemente, basándose en la localización cromosómica y en la similitud que presenta la proteína para la que codifica con ATPasas transportadoras de metales pesados. El gen de esta enfermedad se transcribe en un mRNA de 7,5 kb que se expresa predominantemente en placenta, hígado y riñón, que codifica para una proteína de 1.411 aminoácidos, miembro de la subfamilia de proteínas P-ATPasa, homóloga con otra proteína implicada en el transporte de cobre, que se halla alterada en la enfermedad de Menkes (proceso de inicio en la infancia, con degeneración cerebral y retraso mental, anomalías faciales, hipopigmentación, cambios cutáneos y óseos, roturas arteriales, trombosis e hipotermia); en esta enfermedad existen cambios bioquímicos similares a los de la enfermedad de Wilson, pero sin alteraciones hepáticas. En el gen de la enfermedad de Wilson se han detectado varias mutaciones puntuales, responsables de este proceso. El aislamiento de los genes de la enfermedad de Menkes y de Wilson debe permitir comprender el papel del cobre en el organismo, a la vez que debe proporcionar las bases para la prevención y el tratamiento de estos procesos.

## Identificación de genes: nuevas técnicas, nuevo conocimiento

El avance en la identificación de genes implicados en patología genética es incesante. Los genes de la adrenoleucodistrofia, esclerosis lateral amiotrófica familiar, coroideremia, enfermedad de Norrie, síndrome de Waardenburg, enfermedad granulomatosa crónica, miosina cardíaca, etc., han sido identificados recientemente. Para muchas enfermedades sólo se ha podido localizar el cromosoma en el que se encuentran los genes implicados en ellas, y es sólo cuestión de tiempo la identificación final de los genes. Es de esperar que en los próximos años la mayoría de los genes implicados en enfermedades serán identificados. Los nuevos descubrimientos permiten acercarnos a las bases moleculares de las enfermedades de forma rápida. Las herramientas diagnósticas que se generan permiten una medicina predictiva eficaz. Finalmente, el conocimiento sobre las bases moleculares de las enfermedades permitirá abordar la terapia de un modo más adecuado y abre la posibilidad a la corrección génica.

### Bibliografía especial

- AHN AH, KUNKEL LM. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature Genet* 1993; 3: 291.
- GOATE AM, HAYNES AR, OWEN MJ, FARRALL M, JAMES LA, LAI LY et al. Pre-disposing *locus* for Alzheimer's disease on chromosome 21. *Lancet* 1989; 1: 352-355.
- HAYASAKA K, HIMORO M, SATO W, TAKADA G, UYEMURA K, SHIMIZU N et al. Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin Po gene. *Nature Genet* 1993; 5: 31-34.
- HUMPHRIES P, KENNA P, FARRAR GJ. On the molecular genetics of retinitis pigmentosa. *Science* 1992; 256: 804-808.
- Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993; 72: 971-983.
- MATILLA T, VOLPINI V, GENÍS D, ROSELL J, CORRAL J, DAVALOS A et al. Presymptomatic analysis of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) via the expansion of the SCA1 CAG-repeat in a large pedigree displaying anticipation and parental male bias. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 123-128.
- McKUSICK VA. Mendelian inheritance in man. Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes, 10.<sup>a</sup> ed. Baltimore, Johns Hopkins University Press, 1992.
- MORRAL N, NUNES V, CASALS T, CHILLÓN M, GIMÉNEZ J, BERTRANPETIT J et al. Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: mutation frameworks and evolutionary tracers. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1.015-1.022.
- PETERS DJM, SPRUIT L, SARIS JJ, RAVINE D, SANDKUIJL LA, FOSSDAL R et al. Chromosome 4 localization of a second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nature Genet* 1993; 5: 359-362.

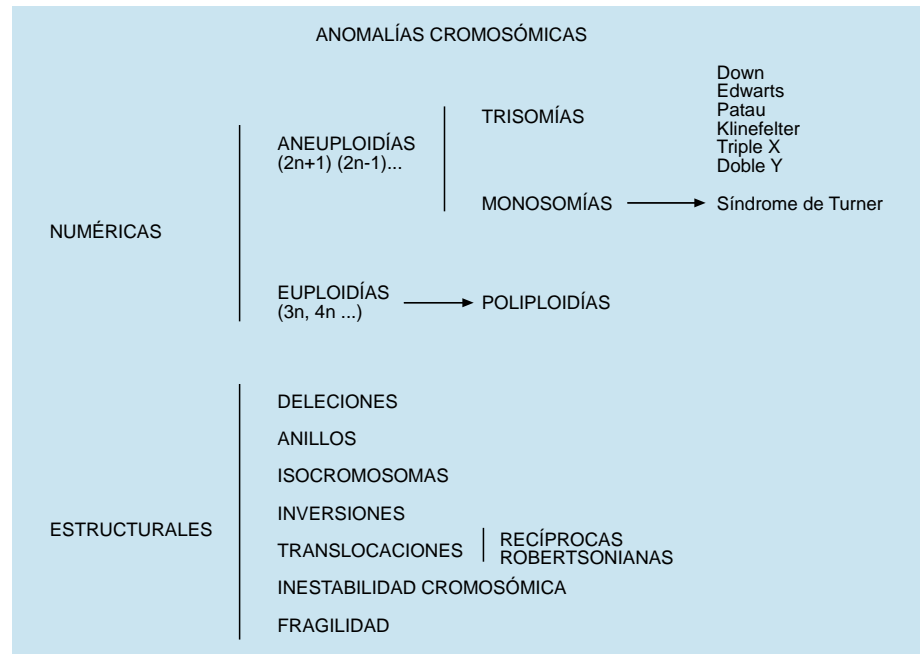
## Anomalías cromosómicas

M. Milà Recasens y X. Estivill Pallejà

### Anomalías cromosómicas

Cualquier variación en el número y/o en la morfología de los cromosomas de un individuo constituye una anomalía cromosómica. Las anomalías pueden ser numéricas o estructurales (fig. 9.33).

Las *alteraciones numéricas* constituyen cambios en la dotación total de cromosomas. Cuando los cromosomas de más o de menos constituyen un juego completo se habla de *euploidías*: *triploidía*  $3n$ , *tetraploidía*  $4n$  y, en general, *poliploidía*. Cuando los cromosomas de más o de menos no corresponden a un juego completo se designan *aneuploidías*. En general se trata de un cromosoma en exceso o defecto, de-



**Fig. 9.33.** Clasificación de las anomalías cromosómicas. En las fórmulas  $n$  indica dotación haploide;  $(2n+1)$ , trisomía;  $(2n-1)$ , monosomía;  $3n$ , triploidía, y  $4n$ , tetraploidía.

nominándose *monosomía*  $2n-1$ , o *trisomía*  $2n+1$ , respectivamente.

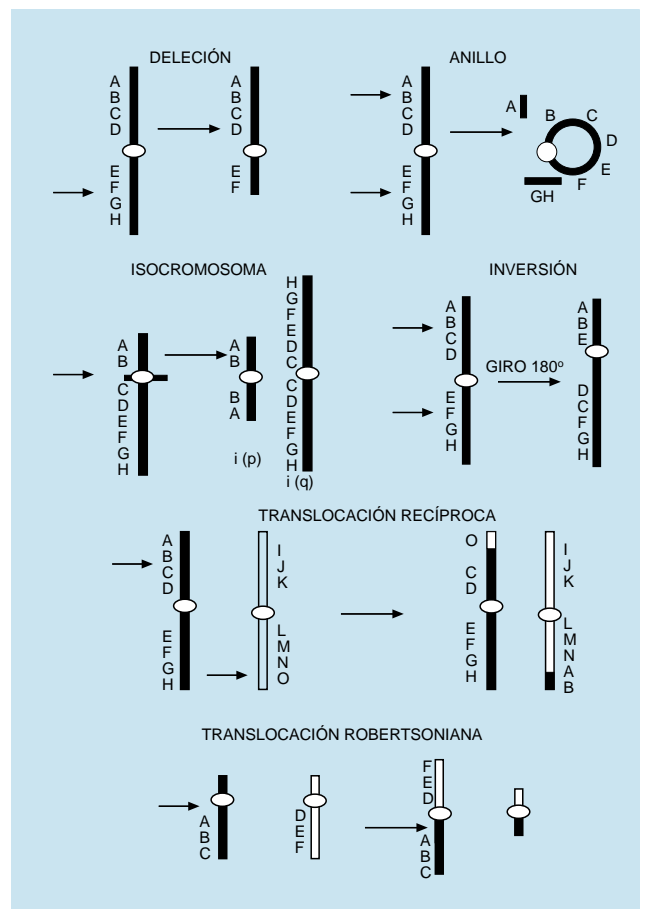
Las *anomalías estructurales* son aquellas en las que uno o más cromosomas alteran su morfología, variando de forma y/o tamaño. El resultado puede ser una alteración cromosómica *equilibrada*, cuando el contenido total de material genético se conserva, o *desequilibrada*, cuando se gana o pierde material.

La estructura de los cromosomas es estable, pero, espontáneamente o por la acción de un agente externo, pueden romperse. Cuando esto sucede, sus extremos se convierten en cohesivos, siendo susceptibles a una nueva unión. Habitualmente la célula repara la mayoría de las agresiones externas, de forma que la mayoría de las lesiones no tienen consecuencias. Sin embargo, en aquellos casos en los que no hay reparación, o ésta es defectuosa o insuficiente, puede producirse una alteración cromosómica. Las alteraciones estructurales básicas son las roturas, las cuales originan una discontinuidad en el cromosoma, que conduce a la formación de una *delección* o a un fragmento *acéntrico* (sin centrómero).

Las *delecciones* consisten en la pérdida de una parte del cromosoma, dando como resultado una *monosomía* para la parte deleccionada. En la mayoría de los casos se producen *de novo*, mientras que en el 10-15% corresponden a segregaciones anómalas, como consecuencia de una alteración parental equilibrada. Cuando se producen dos roturas a ambos lados del centrómero en un mismo cromosoma y posteriormente se unen los extremos se forma un *anillo*. Otra posibilidad es la formación de un cromosoma *dicéntrico*, el cual posee dos centrómeros y es el resultado de dos roturas en dos cromosomas distintos y la posterior reunión de los dos fragmentos que incluyen el centrómero. La supervivencia de estos cromosomas está supeditada a la inactivación de uno de los centrómeros, actuando uno solo y funcionando como un monocéntrico.

Las *inversiones* se producen como resultado de dos roturas en un mismo cromosoma; el fragmento roto gira  $180^\circ$  y se reinserta en el cromosoma. El material que contiene este cromosoma es el mismo que en su forma original, pero su orden es distinto.

En el caso de roturas en cromosomas distintos, pueden producirse reorganizaciones cromosómicas. Las alteraciones más comunes son las *translocaciones*, las cuales consisten en intercambios de fragmentos entre cromosomas homólogos o



**Fig. 9.34.** Esquema de los mecanismos de formación de las principales anomalías cromosómicas.  $i(p)$ : isocromosoma de brazos cortos;  $i(q)$ : isocromosoma de brazos largos.

entre cromosomas distintos. Cuando el intercambio se produce entre las zonas terminales se denominan *recíprocas*; si es una parte de un cromosoma que se intercala en otro se designan *inserciones*, y cuando se producen entre dos cro-

mosomas acrocéntricos (grupos D y G) se denominan *robertsonianas*; en estos casos los dos brazos largos de ambos cromosomas quedan preservados y los cortos se pierden.

Se denomina *isocromosomas* a los cromosomas en los que un brazo es la imagen especular del otro, de manera que está formado por dos brazos idénticos, ya sean los dos cortos o los dos largos; su formación ocurre durante el período de división y se debe a que el centrómero se divide de forma transversal en lugar de hacerlo longitudinalmente, que es lo habitual (fig. 9.34).

Si las roturas ocurren en la fase G2, por lo general se rompe una sola cromátide; los tipos de alteraciones que se producen son básicamente las mismas, pero no afectan al cromosoma en su totalidad. A veces pueden aparecer configuraciones que son el resultado de translocaciones o de intercambios entre cromátides y que se denominan *imágenes triradiales*. Estas configuraciones se deben por lo común a la acción de un mutágeno o bien forman parte de un síndrome, como es el caso de la anemia de Fanconi, en la que pueden utilizarse como signo diagnóstico.

Los efectos de una alteración cromosómica en el fenotipo están relacionados más a menudo con las funciones reguladoras y de dosis de un gen, que con un defecto estructural en su seno. De hecho, cualquier variación en lo que se considera como cariotipo normal puede implicar un efecto fenotípico, cuyo grado dependerá de la cantidad de material implicado y de su relevancia (si se trata de un autosoma o un gonosoma o si implica *heterocromatina* o *euromatina*). Cuando el material implicado es euromatina generalmente comporta consecuencias, entre las que se deben destacar retraso mental y retraso en el desarrollo, como las más generales, y las variaciones dismorfológicas y/o malformaciones debidas a los genes perdidos o duplicados, que a menudo darán un patrón de anomalías característico de una alteración cromosómica determinada, constituyendo un *síndrome cromosómico*.

## Anomalías numéricas

### Anomalías numéricas de los autosomas

Más de dos tercios de las alteraciones cromosómicas se asocian a abortos espontáneos, y casi la mitad de las alteraciones que se encuentran en los recién nacidos consisten en la presencia de un cromosoma extra, ya que las monosomías totales son incompatibles con la vida. Para la mayoría de los casos no existe historia familiar de alteraciones y el riesgo de recurrencia en las madres jóvenes que tienen un hijo con una alteración cromosómica es del 1%.

Se estima que la frecuencia con la que se presenta de un cromosoma extra (*aneuploidía*) en el momento de la concepción es alrededor del 10%, aunque podría incluso ser mayor. La mortalidad perinatal y los abortos espontáneos contribuyen notablemente a disminuir la incidencia de las alteraciones en el número de cromosomas en el total de niños que nacen. Las trisomías constituyen la anomalía cromosómica más frecuente y se deben a una ausencia de *disyunción*, por lo general de origen materno, fenómeno que está directamente relacionado con la edad. Pese a que se han descrito varias trisomías parciales, existen tres trisomías completas que tienen una elevada incidencia: la trisomía 21 (1 en 700), la trisomía 18 (1 en 8.000) y la trisomía 13 (en 4.000-10.000). De todas ellas, prácticamente sólo los pacientes con trisomía 21 llegan a la edad adulta, mientras que el 90% de los pacientes con las otras dos en general no sobreviven más allá del año de vida. Otras trisomías llegan a término sólo en forma esporádica, y la mayoría de los casos que sobreviven se encuentran en estado de *mosaicismo* (no todas las células del individuo tienen la alteración) o trisomía parcial.

### Trisomía 21: síndrome de Down

La trisomía 21 es la cromosopatía más frecuente y la primera causa de retraso mental. Las alteraciones morfológicas del síndrome de Down o trisomía 21 son muy características, siendo fácil el diagnóstico clínico. Estas alteraciones incluyen hipotonía, braquicefalia, hipertelorismo, epicanto, presencia de manchas de Brushfield, protrusión lingual, paladar ojival, orejas de implantación baja, dedos de las manos cortos y curvados, surco simiesco, clinodactilia del quinto dedo y mayor espacio entre el primer y el segundo dedos de los pies. El 40% de los pacientes padecen malformaciones cardíacas. Otras complicaciones que presentan son atresia duodenal, epilepsia, mayor susceptibilidad a infecciones y leucemia.

El retraso mental es la complicación más importante del síndrome. Los pacientes tienen un coeficiente intelectual inferior a 50. El 95% de los casos de síndrome de Down tienen una trisomía 21 regular con cariotipo 47, +21. Alrededor del 1% de los pacientes con síndrome de Down son mosaicos, con la coexistencia de una línea normal de 46 cromosomas y una línea trisómica de 47, +21. El 4% de los casos de síndrome de Down tienen una alteración no equilibrada cuyo origen es una translocación robertsoniana ya sea parental o *de novo*. Estas translocaciones afectan principalmente los cromosomas 14, 22 y 21, que se fusionan con el cromosoma 21.

Una pareja joven con un hijo con síndrome de Down con una trisomía regular tiene un riesgo de recurrencia del 1-2%. En los casos de padres portadores de translocaciones la recurrencia dependerá de los cromosomas implicados y del origen materno o paterno, siendo el riesgo menor cuando el portador de la translocación es el padre (< 5%) y de un 10% cuando la portadora es la madre. La situación extrema la constituye la translocación (21,21), paterna o materna, para la que no hay posibilidad de descendencia normal. Para la población general el riesgo de recurrencia está en relación directa con la edad materna, de forma que a los 40 años se sitúa alrededor de 1 en 50. La edad materna superior a 35 años y la existencia de antecedentes familiares y/o de cromosopatía son indicaciones de *diagnóstico prenatal*.

El 95% de los casos de síndrome de Down se deben a ausencia de disyunción cromosómica durante la meiosis. Los marcadores polimórficos del DNA han permitido determinar en qué progenitor se ha producido la alteración y en qué etapa de la meiosis ha sucedido. El 80% de los casos se deben a una no disyunción durante la primera división meiótica y el 75% es de origen materno, guardando relación con la mayor edad de la madre.

La existencia de casos raros con trisomías muy parciales ha permitido localizar la región q22.2-q22.3 como la responsable directa de las alteraciones presentes en el síndrome de Down, siendo posible encontrar casos sin trisomía citogenética, pero con el defecto situado a nivel molecular, con implicación de una región de menos de 5 Mb del cromosoma 21.

El cromosoma 21 ha sido el primer autosoma para el que se ha construido un mapa integral genético, físico, de clones y de alteraciones cromosómicas. Esta información permitirá identificar y aislar la totalidad de los aproximadamente 1.500 genes que contiene el cromosoma 21. El estudio detallado de la región q22.2-q22.3 permitirá detectar los genes implicados en la patogenia de las distintas alteraciones que presentan los pacientes con síndrome de Down. Por otra parte, mediante el estudio detallado de la región centromérica del cromosoma 21 se podrán dilucidar las alteraciones en la ausencia de disyunción, responsables de la trisomía 21.

### Trisomía 18: síndrome de Edwards

La incidencia de esta alteración es de uno de cada 8.000 nacimientos, con un exceso en el sexo femenino respecto al masculino (4:1). La incidencia real es probablemente mucho mayor, ya que el 95% de los fetos afectados son abortados de forma espontánea. El 90% de los afectados mueren durante



el primer año. Las malformaciones características del síndrome incluyen retraso de crecimiento, frente ancha, occipucio prominente, micrognatia, malformación de las orejas, esternón corto y pelvis estrecha, entre otros. El aspecto de las manos es muy característico con los dedos siempre en la misma posición: el segundo dedo cabalga sobre el tercero, y el quinto sobre el cuarto, tanto es así que en algunos casos ha permitido el diagnóstico prenatal ecográfico. Los pacientes presentan malformaciones renales, cardíacas y de otros órganos. El retraso mental es muy profundo. La mayoría de los casos se deben a una trisomía regular por no disyunción durante la primera o la segunda división meiótica, mientras que el 10% de los casos corresponden a mosaicismos, mostrando una clínica menos grave y una mayor supervivencia. En el riesgo influye la edad materna, pero los padres que tienen un hijo con trisomía 18 no tienen un mayor riesgo de recurrencia, con excepción de los casos en los que uno de los padres es portador de una translocación equilibrada.

### Trisomía 13: síndrome de Patau

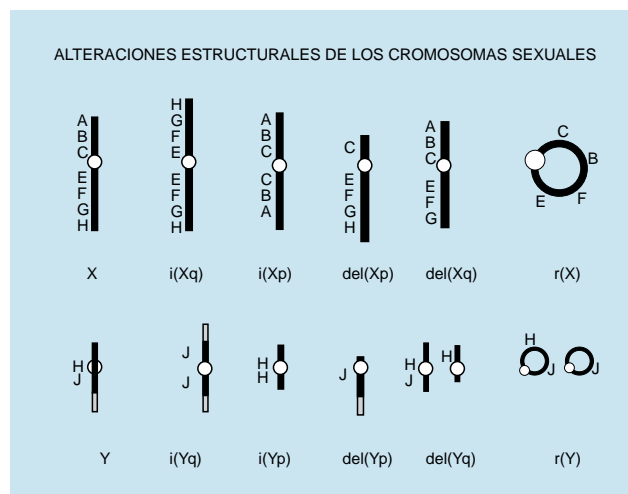
La incidencia se calcula entre uno de cada 4.000 a 10.000 recién nacidos. Sólo el 10% sobrevive al año de vida. La mayoría de los pacientes padecen ceguera, sordera y crisis epilépticas, presentando la totalidad retraso mental muy profundo. Algunas de las principales características son microcefalia, microftalmía, orejas malformadas, paladar y labio hendidos y polidactilia. Las malformaciones congénitas afectan el cerebro, los riñones y el corazón. El 75% de los casos se deben a no disyunción meiótica y, por lo tanto, muestran una trisomía regular con la consiguiente influencia de la edad materna; el 20% se debe a la presencia de una translocación robertsoniana, fundamentalmente  $t(13q14q)$  en uno de los padres, y el resto es causado por translocaciones *de novo*. En alrededor del 5% de los casos existe mosaicismo. El riesgo de recurrencia es inferior al 1%, incluso en aquellos casos en los que alguno de los padres sufre una  $t(13q14q)$ .

## Alteraciones de los cromosomas sexuales

Las anomalías en los cromosomas sexuales tienen una repercusión fenotípica menor que la de los autosomas. La principal característica de las alteraciones de los cromosomas sexuales es la esterilidad, contrastando con las anomalías de los autosomas que se asocian casi siempre a malformaciones graves y retraso mental. Las alteraciones de los cromosomas sexuales más frecuentes son el síndrome de Turner (45,X), el síndrome de Klinefelter (47,XXY), el síndrome del triple X (47,XXX) y el síndrome doble Y (47,XYY). Otras alteraciones menos frecuentes incluyen las translocaciones entre el cromosoma X o Y y un autosoma, y las translocaciones entre los cromosomas X e Y (fig. 9.35).

### Síndrome de Turner

TURNER describió en 1938 un síndrome en mujeres de talla baja (130-150 cm), con disgenesia gonadal, *Pterygium colli* y *Cubitus valgus*. Otras manifestaciones clínicas frecuentes son amenorrea primaria, linfedema en las recién nacidas, coartación aórtica y acortamiento del cuarto metacarpiano. El desarrollo intelectual es normal en la mayoría de las pacientes. Las manifestaciones clínicas son variables debido a que el síndrome engloba alteraciones distintas en el cariotipo, siendo la más típica (40-60% de los casos) la monosomía del cromosoma X (45,X). Otras alteraciones incluyen: 46,X,i(Xq) isocromosoma de brazos largos, que supone una monosomía para los cortos y una trisomía para los largos; 46,X,del Xp, delección de brazos cortos; 46,X,del Xq, delección de brazos largos, y otras alteraciones estructurales del cromosoma X, como un cromosoma X en anillo 46,X,r(X), 46,X,i(Xp) isocromosoma de brazos cortos, translocaciones del cromosoma X a un autosoma e inversiones. Los mosaicis-



**Fig. 9.35.** Representación esquemática de alguna de las principales anomalías estructurales de los cromosomas sexuales. *i*: isocromosoma; *del*: delección; *r*: anillo; *p* y *q* indican brazos cortos y largos, respectivamente. La zona terminal de los brazos largos del gonosoma Y corresponde a una zona heterocromática.

mos son también frecuentes. Recientemente se ha puesto de manifiesto que en el 5% de las mujeres con este síndrome se detecta la presencia de parte del gonosoma Y. El interés de su detección radica en que el 30% de las pacientes con parte del gonosoma Y desarrollan un gonadoblastoma o disgerminoma.

El síndrome de Turner tiene una incidencia de uno de cada 2.500 a 3.500 mujeres recién nacidas, aunque la frecuencia en la concepción es mucho más elevada, ya que son responsables de la quinta parte de todos los abortos espontáneos del primer trimestre. La mayoría de las anomalías son de origen materno, aunque no hay una asociación directa con la edad de la madre.

### Síndrome de Klinefelter

El síndrome de Klinefelter puede definirse como varones con hipogonadismo que poseen como mínimo dos cromosomas X y uno Y. La incidencia es de uno de cada 1.000 varones recién nacidos. El 10% de los varones estériles tienen este síndrome, así como el 1% de los recluidos en instituciones mentales. Es la causa más frecuente de hipogonadismo y esterilidad en varones. En general son de elevada estatura, presentan hipoplasia testicular y producen concentraciones bajas de testosterona, con lo que el desarrollo de los rasgos sexuales secundarios es escaso, apareciendo ginecomastia en el 40% de los casos. El tratamiento con testosterona puede mejorar las características sexuales secundarias, aunque persiste la esterilidad. El coeficiente intelectual es algo inferior al normal, con retraso mental notable en el 20% de los casos. El cariotipo es 47,XXY, siendo raras las anomalías estructurales, y en el 10% de los casos se detectan mosaicismos. Se describen también *polisomías X* (48,XXX o 49,XXXX) que pueden formar parte de mosaicos con líneas normales de 46,XY o 47,XXY. El cromosoma X extra es de origen materno en el 60% de los casos y se produce por ausencia de disyunción en la división meiótica.

### Síndrome del triple X

El síndrome del triple X se presenta en una de cada 1.000 mujeres. El aspecto clínico es totalmente normal, pero el 15-25% tienen retraso mental moderado. Se debe a la ausencia de disyunción en la división meiótica. Alrededor del 75% de los casos son fértiles, y se esperaría que la mitad de la descendencia estuviesen afectados, aunque el porcentaje de hijos sin cromosopatía es superior al esperado.

## Síndrome doble Y

Afecta a uno de cada 1.000 varones. El aspecto fenotípico es normal, supone el 2% de los reclusos en instituciones penitenciarias y el 3% de varones de instituciones mentales. Los pacientes son en general altos y pueden presentar un ligero retraso mental, aunque son más frecuentes los problemas de comportamiento, que se traducen en cierta agresividad. Los pacientes se reproducen normalmente.

## Anomalías estructurales: reordenamientos cromosómicos

Las alteraciones estructurales cromosómicas son el resultado de roturas cromosómicas y uniones anómalas entre ellos. La incidencia de deleciones, duplicaciones o combinaciones de ambas es de uno de cada 2.000 nacimientos. Las alteraciones más frecuentes son las deleciones y las translocaciones.

### Deleciones

Las roturas cromosómicas pueden producir la pérdida de parte de un cromosoma. Si la parte que se pierde es grande, la situación es incompatible con la vida. La mayoría de las deleciones ocurren *de novo* y alrededor del 15% se deben a un reordenamiento equilibrado en uno de los padres, con lo que estas deleciones representan una monosomía o trisomía parciales; las deleciones verdaderas constituyen el 85% de los casos.

Algunos de los fenotipos se asocian a una región cromosómica específica; uno de los más típicos es el síndrome del *maullido de gato*, que se asocia a una deleción en el cromosoma 5: del(5)(p15-pter). El síndrome se caracteriza por microcefalia, retraso mental grave, llanto más agudo de lo normal, cara de media luna, que con la edad se va alargando. Otro síndrome menos frecuente que el anterior es el de Wolf o 4p- que consiste en una deleción de los brazos cortos del cromosoma 4; los pacientes presentan un retraso de crecimiento, encefalopatía y facies típica, "en casco de guerrero griego".

### Síndromes microdelecionales

El desarrollo de las técnicas de alta resolución cromosómica ha permitido la observación de pequeñas anomalías estructurales, microdeleciones, translocaciones, etc. Los ejemplos más claros de esta microcitogenética se hallan en una serie de procesos, entre los cuales los mejor conocidos son: el retinoblastoma, el WARG (tumor de Wilms, aniridia, retraso mental y anomalías genitourinarias), el síndrome de Beckwith-Wiedemann, el síndrome de Langer-Giedion, el síndrome de Prader-Willi, el síndrome de DiGeorge y el síndrome de Miller-Dieker. Los avances en genética molecular y las técnicas de hibridación *in situ* y, en especial, la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) facilitan el diagnóstico de estos procesos.

Estos síndromes se deben a la ausencia de varios genes independientes, pero situados de forma contigua en el cromosoma ("genes contiguos"). Se caracterizan porque alrededor del 50% de los pacientes presentan la alteración estructural visible a nivel citogenético, mediante técnicas de alta resolución cromosómica; un porcentaje reducido (3-5%) es resultado de reorganizaciones cromosómicas, como translocaciones o inversiones, y el resto se debe a deleciones que sólo son visibles a nivel molecular o mediante FISH, debido a que

se trata de pequeñas deleciones, o a un fenómeno de *imprinting* genómico (UDP, disomía uniparental).

### Síndrome de Prader-Willi y síndrome de Angelman

El síndrome de Prader-Willi, descrito en 1956, se caracteriza por hipotonía intensa, hipogonadismo e hipogenitalismo, retraso en la maduración ósea y retraso mental. Su incidencia se calcula entre 1/10.000 y 1/30.000 recién nacidos vivos. Aproximadamente en el 60% de los afectos se observa una deleción intersticial en los brazos largos del cromosoma 15, en la banda q11.1-q13, visible mediante técnicas citogenéticas de alta resolución. En el 20% existe una pequeña deleción en la misma localización, que sólo se pone de manifiesto con técnicas moleculares. Una pequeña proporción de casos presentan alteraciones citogenéticas que implican la banda mencionada (translocaciones, inversiones y presencia de cromosomas marcadores). Existe un grupo de individuos sin deleción aparente que corresponden a una disomía uniparental materna para dicha banda; es decir, poseen dos copias de la madre y ninguna del padre, con lo que se trata de una deleción del material heredado del padre.

Una deleción idéntica 15q11.1-q13 se encuentra en el síndrome de Angelman, que se caracteriza por retraso mental severo, ausencia de lenguaje, movimientos estereotipados, sonrisa permanente (se los ha denominado también *muñecas sonrientes*) y *andar en tirón*. Para este síndrome se describe la misma etiología que para el síndrome de Prader-Willi, pero la pérdida de material genético corresponde al cromosoma materno, o sea del 15q11-13 mat, o disomía parental paterna. Ambos síndromes son fundamentalmente esporádicos, con un riesgo de recurrencia del 0,1% cuando se detecta la deleción citogenética. Cuando ésta no se detecta, si sólo se tiene un hijo afecto, el riesgo es del 0,5%, mientras que con dos hijos o más se eleva al 50%. El hecho de que una misma alteración citogenética tenga un efecto fenotípico distinto dependiendo del origen parental se conoce como *imprinting* genómico.

### Síndrome de DiGeorge

El síndrome de DiGeorge se debe a un defecto en el desarrollo del tercero y el cuarto arcos braquiales y se caracteriza por hipoplasia o aplasia de timo y paratiroides y malformaciones cardíacas, hipocalcemia y facies dismórfica. Su presentación es básicamente esporádica y los estudios citogenéticos detectan una microdeleción en el brazo largo del cromosoma 22, en la banda q11 en la mayoría de los pacientes. En algunos casos la deleción es sólo visible a nivel molecular. A menudo se asocia al síndrome velocardiofacial, por lo que cabe pensar en genes contiguos para ambos síndromes. Actualmente se propone el nombre de síndrome CATCH 22 (defectos cardíacos, facies anormal, hipoplasia de timo, fisura palatina e hipocalcemia) para las deleciones que afectan la zona 22q11. Mediante la combinación de distintas técnicas (citogenética, estudios moleculares y FISH) se detectan deleciones en casi el 90% de los casos de síndrome de DiGeorge y en alrededor del 80% de los de síndrome velocardiofacial. No parece existir un fenómeno de *imprinting* para este síndrome. El consejo genético depende de si alguno de los progenitores es portador de la deleción; se calcula que en el 25% de los casos es así, siendo entonces el riesgo de reincidencia del 50%. En el caso contrario el riesgo de reincidencia es prácticamente nulo.

### Síndrome de Langer-Giedion (tricorninofalángico)

El síndrome de Langer-Giedion se caracteriza por dismorfia craneofacial, escaso pelo, piel laxa, nariz en forma de pera y anomalías esqueléticas. Se debe a una deleción que afecta la región 8q24.1, detectable mediante técnicas de alta resolución cromosómica y/o técnicas moleculares. Su pre-



sentación es esporádica, pero cuando se detectan casos familiares la delección sigue un patrón de herencia dominante.

### Síndrome de Miller-Dieker

El síndrome de Miller-Dieker es una alteración poco frecuente que consiste en lisencefalia, facies característica y otras malformaciones. Inicialmente se la consideró una enfermedad autosómica recesiva, pero el 90% de los pacientes afectados por este síndrome presentan microdelecciones en el cromosoma 17, a nivel de p13.3, visibles por procedimientos citogenéticos o moleculares. Se sugiere que el síndrome se debe a alteraciones en un grupo de genes contiguos, ya que en algunos casos de lisencefalias aisladas se detectan molecularmente delecciones más pequeñas a este mismo nivel.

### Retinoblastoma

El retinoblastoma se asocia a una microdelección del brazo largo del cromosoma 13 (13q14). En el 5% de los pacientes se detecta la delección cromosómica, que se asocia en algunos casos a retraso mental, con un grado de afectación dependiente del tamaño de la delección. La incidencia se estima en uno de cada 18.000 recién nacidos vivos, pudiendo presentarse de forma esporádica o familiar, con una herencia de tipo dominante. A pesar de la herencia dominante, el mecanismo tumoral se comporta de forma recesiva, siendo necesario que ambos alelos del gen del retinoblastoma (RB1) estén alterados para que se desarrolle el tumor. El gen RB1 codifica para una proteína nuclear que detiene la progresión del ciclo celular en G1, de manera que en su ausencia o deficiencia origina una proliferación celular anómala. Se han detectado mutaciones puntuales y delecciones en el gen RB1 en los pacientes con retinoblastoma, pero también en pacientes con otras neoplasias. El riesgo de recurrencia para una pareja con historia claramente negativa de retinoblastoma y con un hijo afecto de un tumor unilateral es del 5%; si el tumor es bilateral, del 10%, y si existen varios miembros afectados de retinoblastoma en la familia (casos claramente familiares) de tumor unilateral o bilateral, el riesgo se eleva al 50% (fig. 9.36).

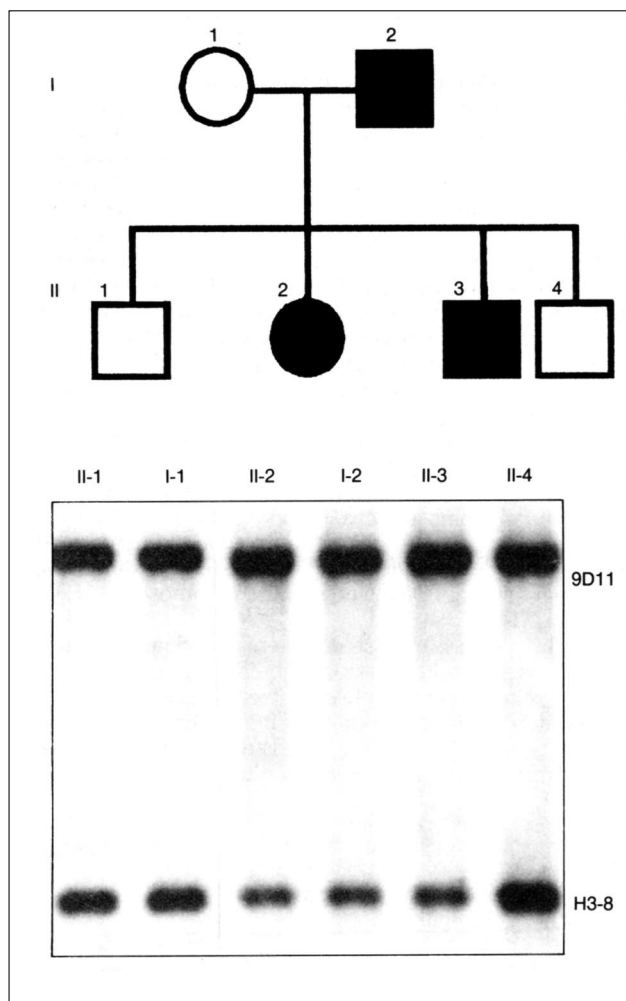
### WARG: tumor de Wilms, aniridia, malformaciones genitourinarias y retraso mental

Desde 1964 se conoce la asociación del tumor de Wilms y la aniridia. El síndrome completo es mucho menos frecuente y en estos casos los pacientes afectados tienen retraso mental y malformaciones genitourinarias, detectándose una delección en 11p13, que puede ser o no visible con técnicas de alta resolución cromosómica. La aparición del tumor de Wilms es un suceso poscigótico, comportándose de forma análoga al retinoblastoma. Los pacientes que son heterocigotos para la delección en otros tejidos, en el tumor los dos alelos se encuentran mutados.

Como mínimo se proponen tres *loci* implicados en el desarrollo del tumor de Wilms: WT1, cuyo papel estaría relacionado con una regulación de la transcripción localizada en 11p13; WT2, situado en 11p15.5 en pacientes con tumor de Wilms, pero en el contexto del síndrome de Beckwith-Wiedemann, y, finalmente, WT3, sin localizar, responsable de una parte de las familias con tumor de Wilms, pero sin ligamiento con los otros dos *loci*. El gen de la aniridia (PAX6) ha sido identificado, permitiendo su diagnóstico.

### Síndrome de Beckwith-Wiedemann

El síndrome de Beckwith-Wiedemann se caracteriza por onfalocelo, gigantismo, macroglosia e hipoglucemia. El síndrome se asocia a una duplicación de los brazos cortos del cromosoma 11 (11p15.5) y su detección citogenética es muy difícil, sólo posible en la prometáfase. En general su presen-



**Fig. 9.36.** Southern blotting para el retinoblastoma. En los tres pacientes afectados hay disminución de intensidad para la sonda H3-8, correspondiente a una delección del gen RB1.

tación es esporádica y sólo se describen casos familiares cuando hay alteraciones cromosómicas estructurales que originan la duplicación. Los casos familiares tienen una transmisión de tipo dominante. Para este síndrome se describe un fenómeno de *imprinting* genómico materno. Se ha identificado un gen denominado IGF2, localizado en 11p15.5, cuya función está relacionada con un factor de crecimiento y al cual se atribuye la responsabilidad del síndrome.

## Translocaciones

Las translocaciones recíprocas son bastante frecuentes, calculándose que uno de cada 1.000 individuos es portador de una translocación equilibrada recíproca, la cual puede dar lugar, en la meiosis, a gametos duplicados y/o delecionados, a gametos normales y a gametos equilibrados, iguales a los originales. Aunque el riesgo teórico para las translocaciones en equilibrio es igual para cada una de ellas, en la práctica depende de los cromosomas implicados y del tamaño del segmento translocado.

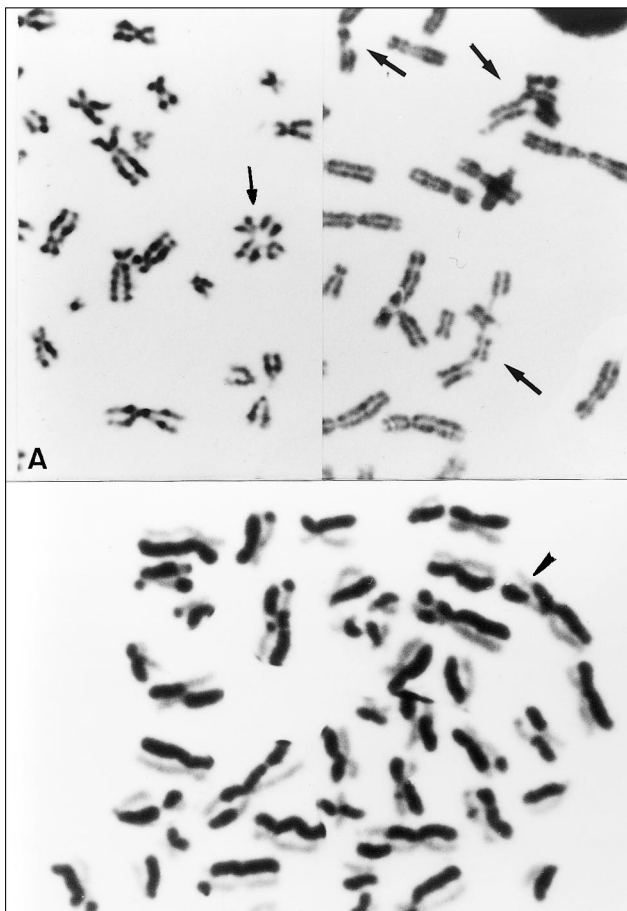
Un tipo particular de translocaciones lo constituyen las *robertsonianas*, cuya relación con los síndromes de Down y de Patau les confiere una mayor relevancia clínica. El origen de las translocaciones está en la fusión céntrica de dos cromosomas acrocéntricos, de forma que quedan los dos brazos largos unidos entre sí, mientras que los dos cortos se pierden sin aparente repercusión clínica. Alrededor del 5% de los casos con síndrome de Down se deben a una translocación parental robertsoniana, siendo la más frecuente t(21q14q).

## Síndromes de inestabilidad cromosómica

Si bien el índice de roturas cromosómicas espontáneas es en general bajo, ciertos síndromes presentan una elevada incidencia de las mismas. Entre ellos cabe destacar la ataxia-telangiectasia, el síndrome de Bloom, la anemia de Fanconi y el xeroderma pigmentoso. Todos estos procesos se heredan de forma autosómica recesiva y se deben a un defecto en un solo gen, que ocasiona inestabilidad genética. El cariotipo en sangre periférica revela una inestabilidad cromosómica, observándose una elevada frecuencia de intercambios de cromátides hermanas y/o roturas cromosómicas (fig. 9.37). En todos estos síndromes existe una elevada tasa de mutaciones espontáneas o inducidas por agentes químicos (alquilantes) o físicos (radiaciones), siendo frecuente en todos ellos la aparición de neoplasias.

La ataxia-telangiectasia tiene una frecuencia de uno en 100.000 y el índice de portadores heterocigotos se calcula en 1 cada 150 individuos. En el cariotipo destaca la presencia de roturas cromosómicas inducidas por radiaciones ionizantes. Los estudios de ligamiento relacionan la enfermedad con un marcador situado en un *cluster* de genes implicados en la reparación del DNA, situado en el cromosoma 11, en la banda 11q22-23.

El síndrome de Bloom se caracteriza clínicamente por retraso del crecimiento y fotosensibilidad. La frecuencia es muy baja; citogenéticamente se detecta un incremento en la tasa de intercambio de cromátides hermanas, que es unas 20 veces la tasa de los controles. Existe una alta sensibilidad cromosómica a los mutágenos químicos y a las radiaciones.



**Fig. 9.37.** Inestabilidad cromosómica. A. Roturas e imágenes trirradiales (flechas). B. Intercambios de cromátides hermanas. Cada cambio de color en la cromátide corresponde a un intercambio (la punta de flecha indica uno de ellos).

Como defecto molecular se postuló un gen responsable de una DNA-ligasa, aunque recientemente se ha descartado esta hipótesis.

La anemia de Fanconi afecta a uno de cada 350.000 individuos, calculándose un índice de portadores de uno en 300 individuos. La leucemia mieloide aguda en estos pacientes es 15.000 veces más frecuente que en la población general. La alteración citogenética típica consiste en la observación de imágenes trirradiales en el cariotipo, tras la inducción con diepoxibutano (agente alquilante bifuncional). La presencia de esta alteración cromosómica puede emplearse como signo diagnóstico. Actualmente se relacionan cuatro genes con la anemia de Fanconi, indicando que se trata de un cuadro heterogéneo. El gen FACC codifica para una proteína cuya función todavía se desconoce, y junto con otros dos se sitúa en el cromosoma 9. Estudios de ligamiento relacionan un marcador D20S20, situado en los brazos largos del cromosoma 20, en el 10% de las familias con anemia de Fanconi.

El xeroderma pigmentoso se manifiesta por fotosensibilidad y una fuerte predisposición al cáncer cutáneo. La frecuencia de afectados es de uno cada 200.000 y la de portadores heterocigotos de uno en 220. En el cariotipo se detectan inestabilidad cromosómica y aumento de la tasa de intercambios de cromátides hermanas tras exposición a los rayos ultravioleta. En la actualidad existen siete posibles genes (heterogeneidad genética), todos ellos implicados en la reparación del DNA tras la exposición a rayos ultravioleta. Se conocen cuatro posibles localizaciones para estos genes: XP-A y XP-D en el cromosoma 19, a nivel de 19q34.1 y 19q134.2, respectivamente, donde parece existir un *cluster* de genes responsables de la reparación del DNA por escisión. XP-B se localiza en el cromosoma 2, y XP-F en el cromosoma 15.

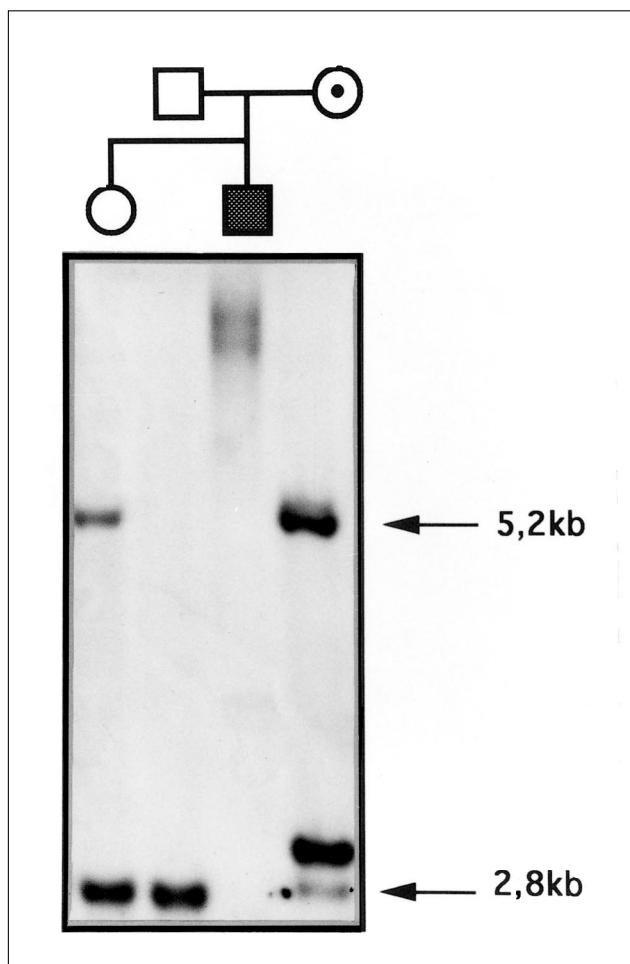
Sabemos que las roturas cromosómicas, ya sean inducidas o espontáneas, no suceden al azar ni siguen una distribución de Poisson, sino que ocurren con mayor frecuencia en unos puntos determinados denominados frágiles. Dichas regiones pueden aparecer como zonas no teñidas y el cromosoma tiende a romperse por estos puntos. Es un hecho constante para una región determinada y sólo se expresa en algunas de las células, nunca en todas. Esta fragilidad se hereda de forma mendeliana, y su estructura y su función son aún desconocidas. Actualmente se conocen dos puntos frágiles que se asocian a enfermedades específicas y ambos se localizan en los brazos largos del cromosoma X: uno en la banda q27.3, dando lugar al conocido síndrome del cromosoma X frágil, y el segundo en q28, asociado a otro síndrome con retraso mental, denominado retraso mental ligado (FRAXE).

### Síndrome del cromosoma X frágil

El síndrome del cromosoma X frágil afecta a uno de cada 1.500 varones y una de cada 3.000 mujeres, siendo la causa más frecuente de retraso mental hereditario y la segunda después del síndrome de Down. Se transmite como un trastorno mendeliano de tipo dominante ligado al cromosoma X, con una penetrancia incompleta (80% para varones y 30% para mujeres) y una expresividad variable. La frecuencia de portadores se estima en 1/700, existiendo tanto varones como mujeres portadores y afectados.

El grado de afectación clínica es muy variable, siendo la tríada más característica el retraso mental, la facies dismórfica y el macrorquidismo en varones. El nombre del síndrome se debe a que los individuos afectados muestran una fragilidad citogenética en el cromosoma X, en la banda Xq27.3, cuando se exponen las células a condiciones de cultivo pobres en ácido fólico. Dicho punto frágil se denomina FRAXA (retraso mental ligado al cromosoma X frágil tipo A).

La alteración molecular responsable del síndrome del cromosoma X frágil, descrita en 1991, afecta a un gen, al que se ha denominado FMR-1. La mutación consiste en el incremento variable de una zona repetitiva (CGG)<sub>n</sub>, acompañado de una hipermetilación de la isla CpG, adyacente al gen FMR-1,



**Fig. 9.38.** Southern blotting para el síndrome del cromosoma X frágil, doble digestión con *EcoRI* y *EagI* e hibridación con la sonda *StB12.3*. Los círculos y cuadrados vacíos indican individuos normales; el círculo con el punto indica una portadora, y el cuadrado sombreado un varón afectado. Los patrones de bandas se corresponden a los fenotipos normal, portadora y afectado, respectivamente.

que causa su inactivación. La inactivación del gen y la falta de síntesis de la proteína para la que éste codifica es la causa de las manifestaciones clínicas del síndrome.

El número de repeticiones CGG es variable en los individuos de la población general, siendo los límites de la normalidad entre 6 y 50 repeticiones, en las que el gen se comporta de forma normal y expresa la proteína FMR-1, cuya función todavía desconocemos. La isla CpG, situada en la región 5' del gen FMR-1, no está metilada en los individuos normales. Esta isla tiene la función de regular la expresión del gen. Cuando el número de repeticiones se sitúa entre 50 y 200, el gen se encuentra en un estado de premutación, en el que la isla CpG se mantiene sin metilar, se sigue transcribiendo la proteína, y el individuo portador no manifiesta alteraciones fenotípicas. En estas circunstancias el número de repeticiones adquiere inestabilidad, tanto meiótica como mitótica, de forma que cada vez que el cromosoma pasa por una división, el número de CGG va aumentando. Esta situación es la que presentan individuos portadores sanos, con riesgo de tener descendencia afectada. A partir de las 200 repeticiones, el gen FMR-1 pasa a una situación de mutación completa, la

isla CpG se hipermetila, el gen FMR-1 deja de transcribir la proteína, y el individuo manifiesta el síndrome del cromosoma X frágil si es un varón, y en ciertos casos si es una mujer. La hipermetilación de la isla CpG se detecta sólo en individuos con la mutación completa, correlacionándose con la falta de expresión (transcripción) del gen FMR-1. El diagnóstico molecular se realiza mediante estudio directo de la expansión de la zona repetitiva y la hipermetilación de la isla adyacente empleando *Southern blotting* (fig. 9.38) y PCR.

Los varones portadores que no presentan manifestaciones clínicas se denominan NTM (*normal transmitting males*), los cuales transmiten a todas sus hijas el gen mutado; aunque éstas nunca manifiestan la enfermedad, se presentará en los hijos varones de la siguiente generación (nietos de NTM) y en el 30% de las mujeres. De este modo, el riesgo de retraso mental se relaciona con la posición que ocupa el individuo en el árbol genealógico, de forma que la mutación progresa a través de las generaciones, fenómeno que se conoce como "anticipación" o paradoja de Sherman.

### Retraso mental ligado al cromosoma X frágil tipo E (FRAXE)

Este síndrome es muy similar al anteriormente descrito, en sus tres aspectos clínico, citogenético y molecular. Clínicamente los pacientes presentan retraso mental, dismorfias y dificultades en el área del aprendizaje. Citogenéticamente se asocia a una fragilidad cromosómica en el brazo largo del cromosoma X, en la banda q2.8, que se pone de manifiesto en cultivos pobres en ácido fólico. El defecto molecular es idéntico al descrito para el FRAXA y se debe a la expansión de un triplete (CGG) y a la hipermetilación de la isla CpG adyacente. Los individuos normales tienen entre 6 y 25 copias, mientras que los afectados tienen más de 200; a diferencia del SFX (FRAXA), el número de CGG puede sufrir una expansión o una reducción a través de las generaciones. La reducción se produce fundamentalmente cuando se hereda a través de varones transmisores a sus hijas y se expande cuando pasa de esta mujer a sus hijos. Debido a la posibilidad de reducción a veces se detectan saltos de generaciones. No hay homología con el gen FMR-1 en cuanto a la proteína, tan sólo respecto al tipo de mutación.

#### Bibliografía especial

- DE LA CHAPPELLE A. Sex chromosome abnormalities. En: EMERY AH, RIMON DL, eds. Principles and practice of medical genetics. Edimburgo, Churchill Livingstone, 1990; 297-301.
- DE GROUCHY J, TURLEAU C. Autosomal disorders. En: EMERY AH, RIMON DL, eds. Principles and practice of medical genetics. Edimburgo, Churchill Livingstone, 1990; 247-272.
- DITTRICH B, ROBINSON WP, KONOBLANCH H, BUTTING K, SCHMITHK K, GILLESSEN-KAESBACH G et al. Molecular diagnosis of Prader-Willi and Angelmann syndromes by detection of parent origin specific DNA methylation in 15q11-13. *Hum Genet* 1992; 3: 313-315.
- SCHMICKEL RD. Contiguous gene syndromes: A component of recognizable syndromes. *J Pediatr* 1986; 109: 231-241.
- VERKERK AJMH, PIERETTI M, SUTCLIFFE JS, YING-HUI FU, DEREK PA, PIZZUTI A et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 65: 905-914.
- YU S, PRITCHARD M, KREMER E, LYNCH M, NANCARROW J, BAKER E et al. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 1991; 252: 1.179-1.181.

# Mapa del genoma humano

X. Estivill Pallejà

---

## Mapa del genoma humano en perspectiva

---

Los métodos de observación microscópica para el estudio de los cromosomas, desarrollados en los años cincuenta, y los avances en la localización cromosómica y el análisis molecular de los genes realizados durante los últimos 20 años han supuesto un cambio sustancial en la genética clínica y en la medicina en general. Este cambio es comparable al experimentado con la aportación que en su día realizaron la anatomía, la fisiología y la patología al conocimiento médico.

La naturaleza de la herencia fue descrita por MENDEL en 1865 y los cromosomas por FLEMMING en 1877. Sin embargo, fue SUTTON, en 1902, quien propuso que los cromosomas eran portadores de información genética, y MORGAN quien realizó, a principios de este siglo, estudios que demostraron la situación lineal de los genes en los cromosomas y quien estableció la distancia entre genes, medible mediante la recombinación genética.

El primer gen humano que pudo ser asignado a un cromosoma determinado fue el del daltonismo, deduciendo su localización en el cromosoma X en 1911. Varios rasgos ligados al cromosoma X se han identificado gracias al patrón de herencia característico. La estructura del DNA fue descubierta en 1953 por WATSON y CRICK. El primer gen asignado a un autosoma específico fue el del grupo sanguíneo Duffy en el cromosoma 1, en 1967. La haptoglobina fue asignada al cromosoma 16 al heredarse ligada a translocaciones y fragilidad en dicho cromosoma en ciertas familias. Hacia 1970 se observó la posibilidad de utilizar células híbridas hombre × ratón en la localización cromosómica de genes específicos.

Para estudiar la herencia en el hombre fue necesario desarrollar métodos de análisis distintos a los empleados en animales de experimentación, ya que no es posible controlar los apareamientos. Si bien el primer ligamiento genético entre dos genes se observó entre la hemofilia A (déficit de factor VIII) y el daltonismo, MOHR estableció, en 1951, el primer ligamiento humano en un autosoma, entre el grupo sanguíneo *Lutheran* y un factor secretor, utilizando el método del análisis de pares de hijos (*sib pair*). En los años cincuenta, MORTON elaboró el método de análisis de probabilidad de ligamiento entre *loci* conocido como *lod* (*log odds*), el cual ha sido adaptado mediante programas de ordenador para análisis de ligamiento genético (*Liped* y *Linkage*) por OTT y LATHROP.

La importancia de la información derivada del ligamiento genético en la medicina clínica ha quedado reflejada en los constantes avances que se han producido en las dos últimas décadas. El estudio de la cromatina sexual para la determinación del sexo en los amniocitos sugirió la posibilidad de emplear líquido amniótico para el diagnóstico prenatal de enfermedades hereditarias mediante el estudio de marcadores ligados a éstas. Este tipo de estudios se aplicó con éxito para el diagnóstico de la hemofilia o de la distrofia miotónica.

En los años setenta se produjo un importante avance en el análisis cromosómico, al desarrollar métodos que permiten identificar de forma inequívoca cada cromosoma y el distinto patrón de bandas que presentan. Los principales avances en el análisis molecular fueron debidos al descubrimiento de las enzimas de restricción, en 1970, las cuales permiten *disecionar* el genoma. WATSON y TOOZE consiguieron clonar en fragmentos el DNA *Escherichia coli*. En 1975, SOUTHERN desa-

rolló el método de hibridación en soportes sólidos que hoy en día conocemos como método de *Southern*. A finales de los años setenta se desarrollaron genotecas de la totalidad del genoma humano, genotecas específicas de cada cromosoma y genotecas de DNA complementario (cDNA) de distintos tejidos a partir del RNA mensajero (mRNA).

En 1977 se desarrollaron dos métodos para el análisis de la secuencia de bases del DNA. Estos métodos, descubiertos por MAXAM y GILBERT y por SANGER, permitieron disponer en 1981 de la secuencia de nucleótidos del cromosoma mitocondrial humano. Posteriormente, el análisis detallado de los genes de las globinas humanas, de la insulina, etc., permitió establecer las bases moleculares de muchas enfermedades.

El primer polimorfismo humano del DNA fue descrito por KAN y DOZY en 1978, mediante la enzima *HpaI*, localizada en el extremo 3' del gen de la  $\beta$ -globina. En 1980 BOTSEIN señaló la utilidad potencial de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (FRLP) del DNA en el estudio del genoma humano. ORKIN y KAZAZIAN demostraron la utilidad de varios RFLP en la construcción de haplotipos para el estudio de la betatalasemia. La utilidad clínica de los FRLP quedó demostrada al permitir localizar los genes de la corea de Huntington en 1983, de la enfermedad poliquística del adulto, y de la fibrosis quística en 1985. A partir de este momento se abrieron las posibilidades al diagnóstico y la prevención para estas entidades clínicas y se localizaron muchas más.

---

## Genoma humano: el reto de la complejidad

---

El genoma humano contiene 3 billones de pares de bases (pb) que se encuentran en los 23 cromosomas de cada célula haploide. Las células normales son diploides y, por tanto, tienen 46 cromosomas. Los cambios en la estructura de nuestro DNA, responsables de las enfermedades, se encuentran en algún punto de los 6 billones de pb que forman parte de las células diploides de nuestro organismo. La información de que disponemos en la actualidad sobre nuestro genoma es todavía muy limitada.

El estudio del genoma humano puede enfocarse desde distintos frentes: estudiar las secuencias de DNA, analizar las proteínas o investigar las enfermedades. Existen secuencias de DNA o genes que han sido clonados, debiendo investigarse su participación en procesos patológicos. Las proteínas que se han aislado pueden analizarse a nivel molecular, permitiéndonos conocer los genes que codifican para ellas y desentrañar las bases moleculares que provocan las enfermedades. Finalmente, el análisis de ligamiento genético con marcadores del DNA permite el estudio de las enfermedades hereditarias, pudiendo localizar cromosómicamente el gen responsable, aislarlo e identificar sus defectos moleculares.

El estudio del mapa del genoma humano debe conducir a la localización de todos los genes y marcadores en los distintos cromosomas. El papel central del "mapeo" genético en la investigación médica actual queda reflejado en la gran variedad de genes que se han "mapeado": genes responsables de fenotipos patológicos; proteínas séricas; enzimas del metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos, esteroides, aminoácidos y ácidos nucleicos; hemoglobinas; receptores de hormonas, factores de crecimiento, complemento, virus y toxinas; hormonas; HLA, componentes del complemento, in-



munoglobulinas y receptores para células T; factores de la coagulación; factores de crecimiento; proteínas estructurales; oncogenes; *homeo box*; antioncogenes, etc.

Se ha realizado un total de 12 congresos internacionales sobre el mapa del genoma humano (HGM-1 al HGM-12), los cuales han permitido compartir la información generada en distintos laboratorios y han facilitado la construcción del mapa del genoma humano. El número de genes que conforman el mapa actual es de unos 4.000, que representan el 4-8% del total de genes del genoma humano, que se estima en unos 50.000 a 100.000 genes.

El gran interés que despierta la localización de los genes responsables de enfermedades como la fibrosis quística, la corea de Huntington, la neurofibromatosis tipos 1 y 2, la poliquistosis renal del adulto, la distrofia miotónica y de otras enfermedades, se plasma en el ámbito tanto diagnóstico como terapéutico. La información sobre la posición de cada gen en el genoma ha permitido su aislamiento mediante el empleo de tecnología compleja y una estrategia conocida como *clonación posicional* o *genética inversa*. Una vez identificado un gen es posible determinar la patología molecular subyacente que presenta. Finalmente, el mejor conocimiento sobre las bases moleculares de las enfermedades debe permitir diseñar estrategias terapéuticas más eficaces, las cuales pueden incluir la terapia génica.

## Mapa físico

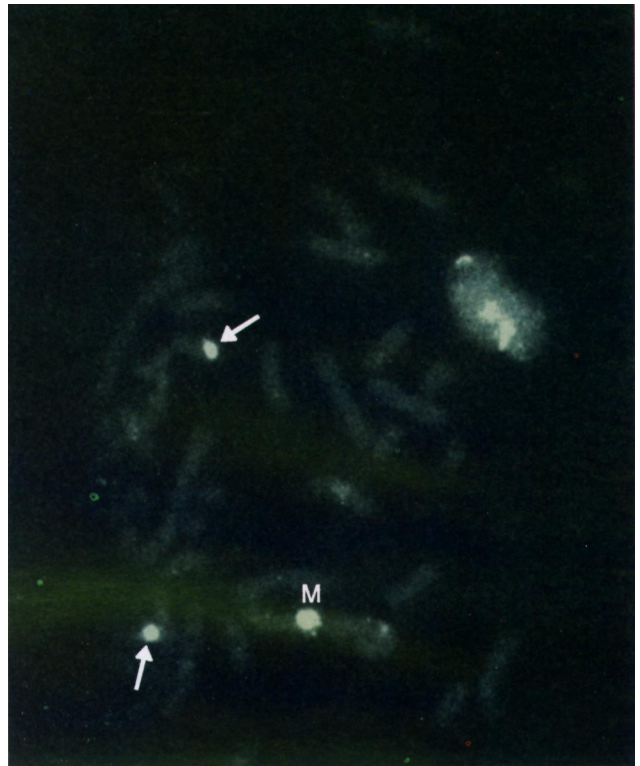
Se han empleado métodos físicos para localizar una secuencia de DNA; del mismo modo, es posible utilizar un fenotipo enfermo para la localización de una anomalía cromosómica. Los métodos físicos permiten el mapeo de *loci* en términos citogenéticos o en unidades de DNA (pares de bases, kilobases, megabases). La nomenclatura citogenética se basa en las bandas que se observan en los cromosomas teñidos. Los marcadores del DNA han contribuido notablemente al desarrollo del mapa físico del genoma humano. En la localización cromosómica de los distintos marcadores se ha empleado una amplia variedad de métodos.

### Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* constituye uno de los métodos más directos para el mapeo. Un fragmento de DNA clonado puede ser hibridado directamente a los cromosomas en metafase, y su localización en el mapa puede elucidarse mediante la inspección microscópica. La hibridación *in situ* ha experimentado un notable avance con el empleo de sondas fluorescentes (FISH), que permiten también el análisis de las células en el período de *interfase*. La resolución que se obtiene con la hibridación *in situ* es de aproximadamente 10-20 millones de pares de bases (fig. 9.39). El estudio en interfase permite resoluciones de hasta 50 kb.

### Células somáticas

La hibridación con células somáticas ha sido el método de mapeo físico más utilizado en genética humana. Si se realiza una fusión de células de ratón y células humanas en cultivo, mediante tratamiento con polietilenglicol, las células híbridas que se forman tienden a perder los cromosomas humanos al azar. De vez en cuando se obtienen *líneas celulares* que contienen todos los cromosomas del ratón y sólo uno o algunos cromosomas humanos. Las líneas celulares deben caracterizarse mediante la observación microscópica. Una vez se dispone de varias líneas celulares bien caracterizadas, es posible localizar cromosómicamente cualquier fragmento de DNA clonado. Si se dispone de líneas que presentan deleciones o translocaciones cromosómicas, es también posible utilizar los híbridos somáticos para la localización del fragmento de DNA en estudio, en función de dichas alteraciones cromosómicas (fig. 9.40). Los híbridos somáticos han permiti-



**Fig. 9.39.** Identificación de un marcador correspondiente al cromosoma 15 (flechas) mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), empleando una sonda fluorescente centromérica de dicho cromosoma. M = marcador.

tido localizar muchos genes y fragmentos anónimos de DNA en el genoma.

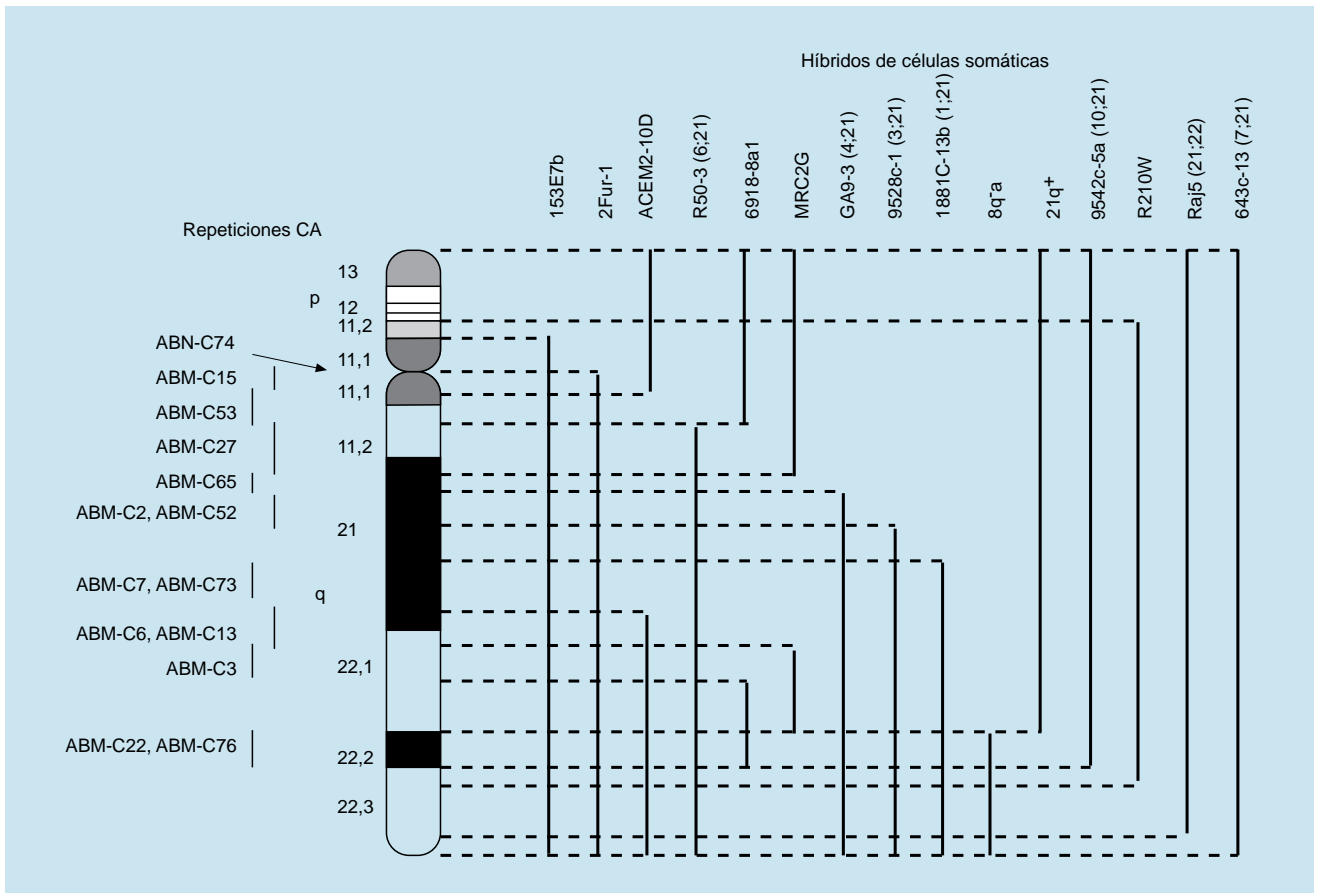
### Alteraciones cromosómicas

Las anomalías cromosómicas constituyen una gran ayuda para el mapeo de genes. La mayoría de las alteraciones cromosómicas afectan a varios genes y producen síndromes multisistémicos. En otros casos, una enfermedad determinada se asocia a una pequeña anomalía cromosómica. En el retinoblastoma, tanto en los casos esporádicos como en los familiares, puede existir una pequeña deleción en el cromosoma 13q14. Aun en los casos sin alteraciones citogenéticas es posible observar la pérdida de la heterocigosidad para marcadores de esta región cromosómica. El gen del retinoblastoma RB1 fue aislado basándose en la alteración cromosómica presente en algunos pacientes.

Existen lugares de fragilidad en los cromosomas que pueden ponerse en evidencia mediante cultivos especiales de las células en estudio. Se han definido 113 lugares frágiles en el genoma humano, 87 de los cuales son bastante frecuentes, mientras que el resto se observa sólo de forma esporádica. Es muy probable que la mayoría de los lugares frágiles del genoma humano estén relacionados con secuencias repetitivas CGG, como es el caso del síndrome del cromosoma X frágil.

Las deleciones y las roturas cromosómicas pueden ser responsables de enfermedades. Muchos tumores están asociados a roturas cromosómicas, algunas de las cuales se corresponden con la localización de oncogenes, como es el caso del oncogén c-ABL (9q34) y la leucemia mieloide crónica, o el c-MYC (8q24) y el linfoma de Burkitt.

Las translocaciones entre el cromosoma X y un autósoma tienen especial interés debido a la inactivación que se produce de uno de los dos cromosomas X en las mujeres. En el caso de que exista una translocación, si el lugar de rotura altera un gen, la mujer portadora estará afectada por el proce-



**Fig. 9.40.** Localización cromosómica de marcadores en el cromosoma 21 humano. Ideograma que muestra un panel de híbridos somáticos del cromosoma 21 para el mapeo de 14 clones que contienen secuencias repetitivas (microsatélites) CA/GT.

so como un varón afecto de la enfermedad. Estos casos señalan la localización cromosómica del gen de la enfermedad. En la distrofia muscular de Duchenne (DMD), estas translocaciones permitieron localizar el gen en la región Xp21. De forma similar, en la neurofibromatosis tipo 1 (Von Recklinghausen) dos translocaciones facilitaron la localización y el aislamiento del gen NF1 en la región centromérica del cromosoma 17.

**Citofluorometría y genotecas específicas de cromosoma**

Los cromosomas pueden separarse mediante citofluorometría de flujo. Su tinción con un marcador fluorescente permite su detección mediante rayos láser de longitudes de onda apropiadas. La intensidad de la señal depende del tamaño del cromosoma, pudiendo seleccionar y separar cada uno de los cromosomas humanos en función de la fluorescencia emitida. Mediante citofluorometría de flujo y/o utilizando híbridos somáticos se han podido obtener genotecas específicas de cada uno de los cromosomas humanos, facilitando la labor del mapeo físico del genoma. Por otra parte, se han desarrollado métodos que permiten diseccionar parte de un cromosoma y construir genotecas enriquecidas en la región cromosómica de interés.

**Electroforesis en geles de campos pulsantes**

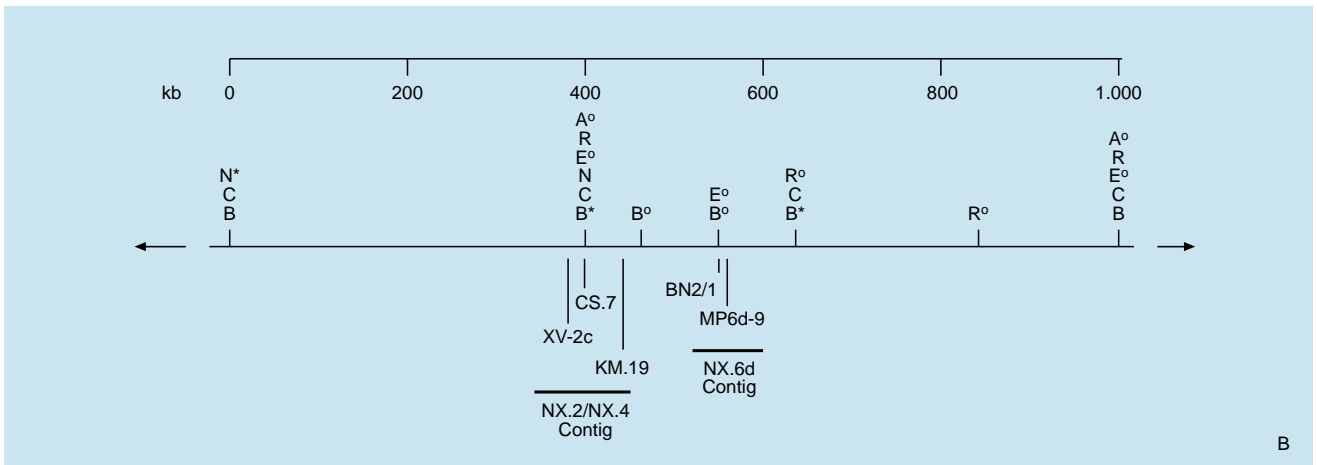
El límite inferior de la resolución cromosómica en citogenética es de unos 3 millones de pares de bases [megabases (Mb)], mientras que la resolución mediante electroforesis convencional es de 20.000-30.000 pb [1.000 pb = 1 kilobase (kb)]. La electroforesis en geles de campos pulsantes (PFGE,

del inglés, *pulsed field gel electrophoresis*) permite cubrir el vacío entre estos dos métodos de mapeo, ya que tiene un poder de resolución de entre 50 kb y 10 Mb. Estos fragmentos largos de DNA pueden separarse debido a que las moléculas de DNA se someten a un campo eléctrico perpendicular a la dirección de migración. Las moléculas de pequeño tamaño se reorientan con mayor facilidad, mientras que las de mayor tamaño tardan más en corregir la trayectoria. Los fragmentos de DNA separados mediante este método pueden ser transferidos a un filtro de nilón e hibridados con una sonda marcada radiactivamente (fig. 9.41). Las enzimas de restricción que se utilizan en este tipo de experimentos reconocen secuencias poco representadas en el genoma de los vertebrados, que facilitan la construcción de los mapas físicos detallados de cualquier región cromosómica.

**Fragmentos de DNA de gran tamaño: YAC**

Es posible construir minicromosomas artificiales humanos que pueden ser propagados en levaduras (YAC, del inglés, *yeast artificial chromosomes*). El sistema se basa en la utilización de un vector que tiene todas las señales específicas de un cromosoma (origen de replicación, centrómero y telómero), pudiendo propagarse de forma estable en células eucariotas como las de la levadura. Este tipo de vectores permite insertar fragmentos de DNA de gran tamaño, lo que facilita el análisis de regiones cromosómicas de especial importancia e interés y permite el estudio de genes de gran tamaño como el de la DMD, la fibrosis quística o el factor VIII de la coagulación, cuyo tamaño genómico (2.300, 240 y 180 kb, respectivamente) no puede ser analizado con facilidad mediante los sistemas de clonación convencionales. Los YAC disminuyen





**Fig. 9.41.** Ejemplo de utilización de la electroforesis en geles de campo pulsante para el mapeo de la región q31 del cromosoma 7 con el mapa de restricción resultante del análisis realizado. A: NaeI; E: EagI; NotI; C: SacII; B: BssHII; R: NarI. kb: kilobases; Contig: clones contiguos.

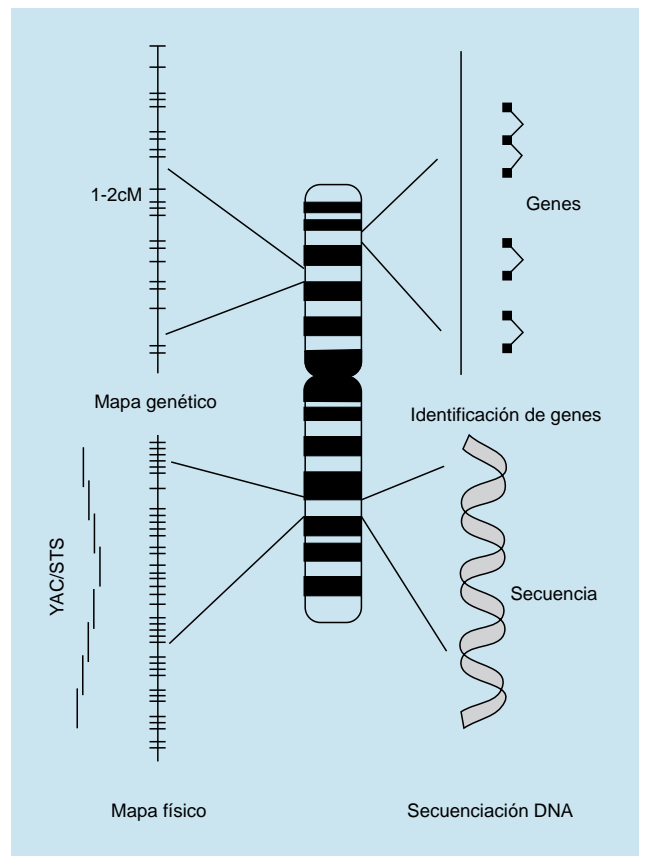
considerablemente la complejidad de los estudios moleculares y permiten disponer de la totalidad del genoma en sólo unas decenas de miles de clones. El empleo de YAC ha sido fundamental para aislar los genes de la poliposis colónica familiar, la corea de Huntington, la neurofibromatosis tipo 2 y el retraso mental ligado al cromosoma X, entre otros. La aplicación de YAC al mapa del genoma humano se ha concretado en la construcción de los mapas continuos de los cromosomas 21 e Y, debiendo estar completados mapas similares para la totalidad de los cromosomas antes de 1995.

### Walking, jumping y linking cromosómicos

Una vez identificada la región cromosómica de interés, es necesario avanzar de forma progresiva hacia el *locus* en cuestión. Esto puede realizarse mediante el aislamiento de clones que se superponen a otros de referencia, de forma que cada vez se avanza en la dirección deseada; este tipo de análisis se denomina *walking* cromosómico. Otra posibilidad es la construcción de genotecas que permiten realizar saltos de 100 o 200 kb desde puntos conocidos hacia el *locus* en cuestión, lo que se designa *jumping* cromosómico; estos clones pueden ser ligados mediante otros, procedentes de genotecas enriquecidas para lugares de restricción que cortan raramente en el genoma de los vertebrados, constituyendo puntos de referencia para realizar saltos en el genoma. Los clones que permiten unir saltos se denominan clones *linking*. Estos estudios permiten un avance rápido en el estudio de regiones cromosómicas sin necesidad de aislar todo el material genético existente entre un punto de partida determinado y el lugar de interés. Esta metodología ha sido muy útil en la clonación de los genes de la fibrosis quística, la neurofibromatosis tipo 1 y la corea de Huntington, entre otros.

### Unidades físicas de mapeo: STS

El desarrollo de las unidades físicas de mapeo, definidas por los STS (*sequence tagged sites*) ha constituido uno de los principales avances en la construcción del mapa del genoma humano. Los STS son marcadores definidos por secuencias de DNA determinadas que sirven de puntos de referencia en la construcción de mapas cromosómicos. Para algunos cromosomas (21 e Y) ya ha sido posible obtener mapas con STS situados a lo largo de todo el cromosoma. Esta situación es mucho más detallada para las regiones cromosómicas en las que se encuentran genes de gran importancia médica. El objetivo del Proyecto Genoma Humano para los próximos 3 años es la identificación de un STS cada 300 kb, debiendo conseguirse que éstos se hallen espaciados cada 100 kb (unos 5 años) para poder efectuar el mapeo de las dis-



**Fig. 9.42.** Objetivos del estudio del genoma humano, entre los que se incluyen el mapa genético, la identificación de genes, el mapa físico y la secuenciación del DNA. YAC: cromosomas artificiales de levaduras; STS: unidades físicas de mapeo; cM: centimorgans. (Modificada de COLLINS F, GALAS D. *Science* 1993; 262: 43-47.)

tintas enfermedades y secuenciar la totalidad del genoma (fig. 9.42).

## Mapa genético

Dos *loci* se encuentran ligados genéticamente si son heredados juntos en el seno de familias con varios miembros, de

forma más frecuente que por el simple azar. Los *loci* que se encuentran ligados están situados en el mismo cromosoma, mientras que la ausencia de *ligamiento genético* implica que estos *loci* se encuentran lejos el uno del otro en el mismo cromosoma o que están situados en cromosomas distintos. La distancia genética entre *loci* está determinada por la frecuencia con que se producen recombinaciones meióticas o *cross-over*. El índice de recombinación ( $\theta$ ) refleja la distancia que separa a dos *loci*. A mayor distancia, las posibilidades de recombinación son mayores. Cuando dos *loci* se encuentran muy cerca, éstos tienen altas probabilidades de heredarse juntos, por lo que se dice que se encuentran ligados. El sistema para valorar este ligamiento es la *cosegregación* a través de varias generaciones (fig. 9.43).

Una de las exigencias de los *loci* en estudio es que deben poder distinguirse mediante un marcador genotípico, como es un RFLP, o un marcador fenotípico, como puede ser una enfermedad. Por otra parte, el número de meiosis (posibilidades de recombinación) debe ser suficiente para tener un valor estadísticamente significativo, que apoye el ligamiento o su exclusión.

Suponiendo que la recombinación genética es la misma para cualquier parte del genoma y que es por igual en ambos sexos, se puede establecer una correlación entre la *distancia genética* entre *loci* y la *distancia física*. La unidad de medida de la distancia genética es el *morgan* o *unidad de recombinación*. La distancia relativa entre distintos *loci* en un cromosoma determinado está relacionada con la frecuencia con la que se producen recombinaciones entre ellos. En los cromosomas humanos existe una media de 52 *quiasmas* (puntos de entrelazamiento entre cromátides) durante la primera división meiótica en el total de 22 pares de autosomas. Los quiasmas se correlacionan con la recombinación genética, por lo que la longitud genética total del genoma humano haploide es de 26 morgans (30 contando el cromosoma X). Si consideramos que la longitud física del genoma humano es de 3 billones de pb, 1 morgan equivale a 100 millones de pb o, lo que es lo mismo, 1 centimorgan (cM) es 1 millón de pb.

Todos los cromosomas tienen una longitud de, al menos, 50 cM, y casi todos sobrepasan los 100 cM. El cromosoma 1 constituye el 9% del total del genoma haploide, mientras que el cromosoma 21 es menos del 2%. Un cM equivale a 1 Mb, y una banda cromosómica equivale a 5 Mb, pudiendo contener entre 100 y 200 genes.

### Ligamiento genético

Es posible estudiar la distancia entre dos *loci* y establecer su orden en el seno de un cromosoma frente a un tercer *locus*. Si consideramos dos *loci* con un polimorfismo dialélico, en el caso de que no exista ligamiento entre ellos, por encontrarse en cromosomas distintos, obtendremos que la mitad de los gametos recombinarán, mientras que la otra mitad permanecerán ligados, por lo que  $\theta = 0,5$ . Por otra parte, si los *loci* están ligados en esta familia,  $\theta$  será igual a 0, pudiendo establecerse que la distancia genética entre los *loci* es nula.

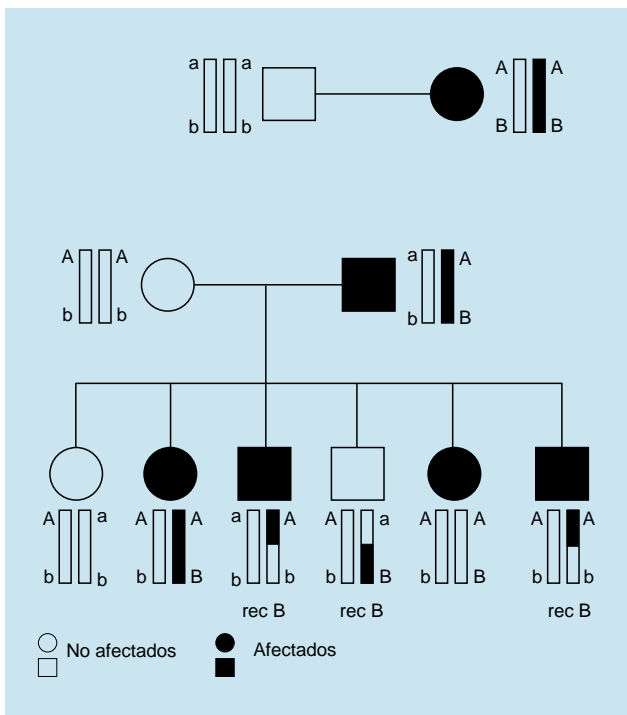
El método de probabilidades para el análisis de ligamiento se basa en la valoración de la *fracción de recombinación*,  $\theta$ , y en probar si una observación determinada es significativamente inferior al 50%. La valoración del ligamiento genético requiere un análisis estadístico en el que se calcula la relación entre dos hipótesis opuestas: a) que los dos *loci* se encuentren ligados a una fracción de recombinación determinada ( $\theta < 0,5$ ) y b) que no exista ligamiento ( $\theta = 0,5$ ). La fracción de estas probabilidades (*odds ratio*) es la posibilidad de que los *loci* se encuentren ligados. Para facilitar el cálculo se utiliza el logaritmo decimal de esta fracción, que se conoce como *lod score*  $Z(\theta)$ :

$$Z(\theta) = \log_{10}[L(\theta)/L(\theta_{0,5})]$$

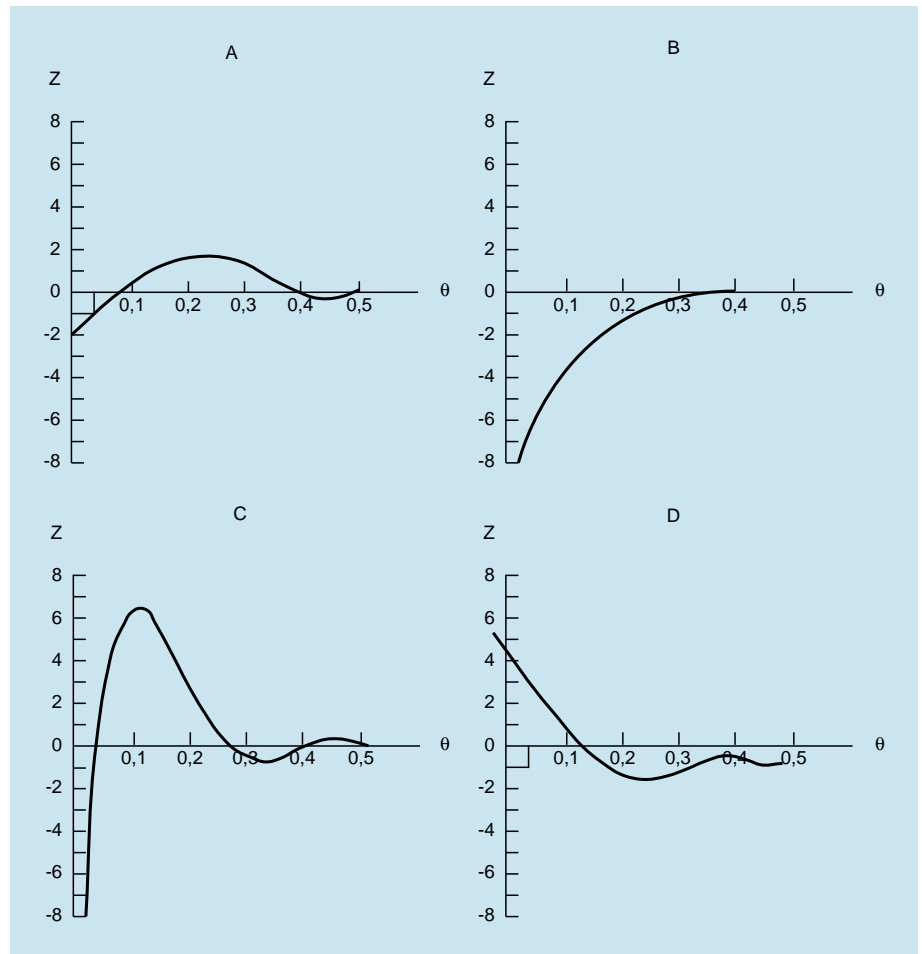
Los *lod scores* se calculan para fracciones de recombinación de 0,0, 0,001, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5. El valor más elevado de  $Z(\theta)$  señalará la fracción de recombinación más probable entre los *loci*. Un  $Z(\theta)$  de 0 significa que puede haber ligamiento o no entre los *loci*; un valor positivo está a favor de ligamiento, y un valor negativo está en contra de él, a la fracción de recombinación señalada (fig. 9.44). Si el  $Z(\theta)$  máximo es igual a 3 o superior, el resultado es significativo e indica que el valor de recombinación  $\theta$  tiene una fiabilidad de uno contra 1.000. La fracción de recombinación a la que se obtiene dicho  $Z(\theta)$  da la distancia genética entre los *loci*, por lo que una frecuencia de recombinación del 1% corresponde a 1 cM. Si el *lod score* es inferior a -2, se puede excluir ligamiento entre los *loci*. Se conviene en admitir como ambiguos los resultados entre -2 y 3.

En la figura 9.44 se muestran cuatro ejemplos: en A los valores de  $Z(\theta)$  están entre 3 y -2, por lo que no es posible ni confirmar ni excluir ligamiento; la curva B permite excluir un ligamiento más cercano a 15 cM, debido a que coincide el límite de exclusión de -2 con la fracción de recombinación de 0,15; la curva C muestra un  $Z(\theta)$  de 6,5, el cual es significativo y corresponde a una  $\theta = 0,1$ , lo que significa una distancia genética de unos 10 cM, suponiendo que la probabilidad es de 1 millón contra uno de que exista ligamiento entre los *loci*, y de que éstos se encuentren separados a una distancia de 10 cM; la curva D muestra un estrecho ligamiento con el valor máximo de  $Z(\theta) = 6$ , con una fracción de recombinación de 0, debido a que no se han observado recombinantes.

Una ventaja en la utilización de *lod scores* es que éstos son aditivos, de forma que si inicialmente los datos recogidos en el estudio de familias para ligamiento de una enfermedad determinada eran insuficientes, se trata de estudiar más familias y sumar los datos obtenidos. Ello representa una considerable ventaja cuando se realizan estudios de ligamiento con enfermedades raras, que requieren de la colaboración entre distintos centros. A pesar de que se considera el límite de un *lod score* de 3 para su credibilidad, existe todavía un 5% de posibilidades de que este *lod* sea debido al azar, por lo que



**Fig. 9.43.** Análisis de ligamiento genético entre una enfermedad autosómica dominante y dos loci definidos por marcadores. La ausencia de recombinación con el locus Aa sugiere que éste se encuentra más cerca del gen de la enfermedad que el locus Bb, con el que se observan tres recombinaciones.



**Fig. 9.44.** Ejemplos de análisis de ligamiento genético mediante el método del lod score (véase texto). A. Para distintos valores de recombinación se obtiene un  $Z(\theta)$  entre 3 y -2, con lo que no es posible confirmar ni excluir ligamiento. B. Se excluye ligamiento a una distancia de 15 cM. C. Ligamiento entre los loci significativo con distancia genética de unos 10 cM. D. Curva de ligamiento genético máximo para una fracción de recombinación de 0.

han de tenerse ciertas reservas para los valores entre 3 y 5, y cierto escepticismo para los inferiores a 3.

El cálculo de  $Z(\theta)$  puede realizarse en forma manual, pero resulta de elevada complejidad cuando se trata de árboles familiares extensos con varias generaciones o cuando se estudian enfermedades complejas. Deben destacarse los programas LIPED y LINKAGE que ayudan a calcular el ligamiento genético y a establecer el orden de *loci*. El último programa permite el análisis de ligamiento con varios *loci*, estableciendo el lugar más probable en el que un determinado *locus* puede encontrarse frente a otros. El *location score* permite conocer la probabilidad de que un determinado *locus* se encuentre entre *loci* conocidos y es igual a:

$$e^{[Z(\theta_A) - Z(\theta_B)]/2}$$

Aunque es posible establecer que la distancia genética es equivalente a la distancia física, existen circunstancias en las que esta equivalencia no se cumple. Por ejemplo, en el genoma pueden existir zonas con una elevada frecuencia de recombinación en las que un valor de 1 cM puede ser mucho menor a 1 millón de pb; del mismo modo, en otras zonas del genoma la recombinación puede ser escasa y 1 cM supone una distancia física muy superior al millón de pb. Por razones desconocidas, la recombinación es generalmente mayor en las mujeres que en los varones. Para algunos cromosomas la longitud genética de la mayoría de los cromosomas de las mujeres es el doble de la de los varones, mientras que la longitud física es idéntica. Entre ciertos *loci* la distancia es superior en los varones que en las mujeres, aunque en general es a la inversa.

En el estudio de la localización de un gen en un cromosoma determinado, las recombinaciones entre *loci* tienen gran

importancia, ya que permiten establecer el orden de los marcadores en relación con el *locus* de la enfermedad. El *análisis de pares de hermanos* es un método muy útil para realizar el mapeo de genes recesivos y es una forma rápida de probar genes candidatos. En este tipo de estudios se analizan pares de hijos afectos y se observan los alelos que se heredan juntos en los dos hermanos con una frecuencia superior al 25%, que sería la probabilidad que existiría al azar.

## Microsatélites: mapas genéticos de nueva generación

En los últimos 3 años se ha desarrollado un nuevo tipo de marcadores que dependen de la variabilidad de secuencias repetitivas cortas del DNA. En general se trata de secuencias CA/GT, AAAT/TTTA, las cuales se encuentran repetidas más de 12 veces en múltiples *loci* del material genético de muchos organismos. Estas secuencias presentan un elevado grado de variabilidad, que se traduce en una heterocigosidad superior al 70%, convirtiéndolas en los marcadores ideales para la construcción del mapa genético. El grupo de WEISSENBACH en Francia ha desarrollado más de 3.000 microsatélites CA/GT, los cuales ya cubren más del 95% del genoma. El estudio de estos marcadores en familias de referencia con muchos miembros ha permitido avanzar considerablemente en el mapa genético del hombre. El objetivo final es disponer de un marcador genético cada 2 cM. Ello permitirá el mapeo de enfermedades hereditarias raras para las que existen pocos miembros afectos, así como el estudio de enfermedades genéticas complejas, entre las que deben incluirse los procesos multigénicos y el cáncer.

### Pérdida de heterocigosidad y estudios de homocigosidad

El análisis de pérdida de heterocigosidad en las afecciones neoplásicas se ha visto facilitado considerablemente por los marcadores con elevado índice de polimorfismo. Estos estudios se basan en la pérdida de alelos en el tejido tumoral, respecto al tejido normal, reflejando una alteración genética en la región del *locus* analizado. Los microsatélites que cubren la totalidad del genoma permiten avanzar en la identificación de genes implicados en patología neoplásica.

Los procesos recesivos pueden analizarse de forma fácil mediante microsatélites que cubran cada uno de los cromosomas. En el caso de consanguinidad (muy habitual en los trastornos autosómicos recesivos) los individuos afectados serán homocigotos para marcadores que cubran una región de unos 30 cM. Esta situación permite el estudio de familias con muy pocos miembros afectados y sanos, y será fundamental para determinar la localización cromosómica de los genes implicados en la mayoría de los procesos autosómicos recesivos.

### Desequilibrio de ligamiento

El estudio de los *haplotipos* (combinaciones de alelos para *loci* ligados o para un mismo *locus* en una población determinada) permite comparar la frecuencia observada con la teórica, derivada de las frecuencias génicas. Cuando éstas coinciden se dice que estos *loci* se encuentran en equilibrio. Si los valores observados son significativamente distintos a los esperados se habla de *desequilibrio de ligamiento*. Es decir, existen asociaciones preferenciales que nos indican una proximidad física entre *loci* o una proximidad en el tiempo entre las mutaciones que han dado lugar a los alelos de estos *loci*. El desequilibrio de ligamiento observado entre *loci* permite establecer la datación de una mutación, como en el caso de la drepanocitosis o anemia de células falciformes, cuyo origen se produjo de forma independiente en tres regiones africanas y en una zona asiática hace más de 3.000 años. En el caso de la fibrosis quística el intenso desequilibrio de ligamiento entre varios marcadores y la enfermedad ha permitido conocer la dirección en la que se encuentra el gen mu-

tado, y sugiere que la principal mutación sucedió hace unos 50.000 años.

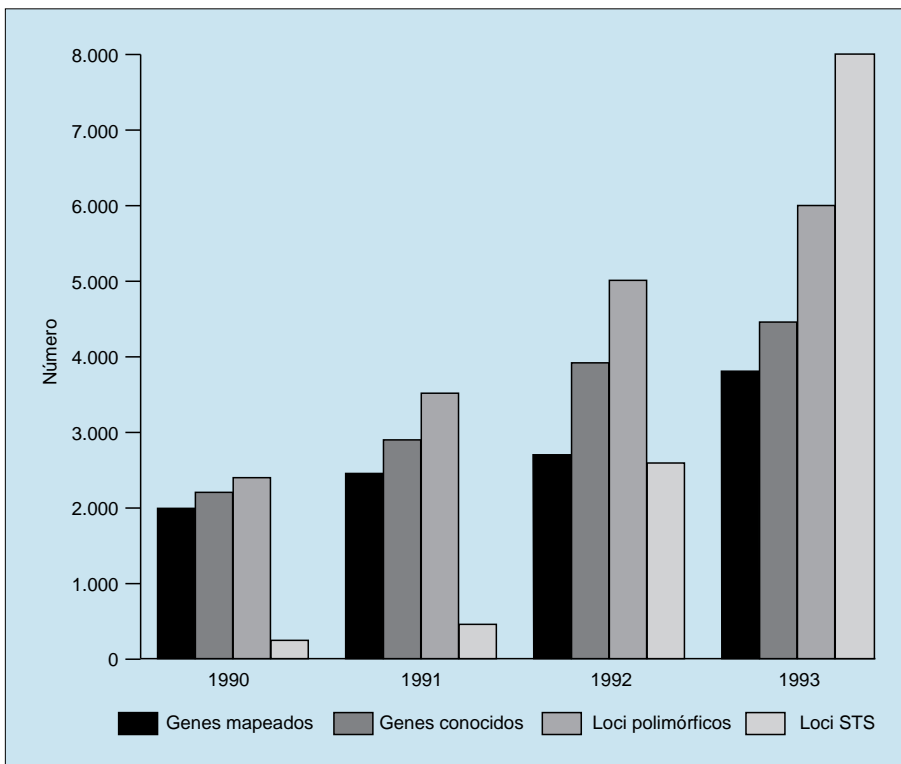
El desequilibrio de ligamiento tiene también implicaciones diagnósticas de interés para ciertos procesos patológicos y ha sido de especial relevancia en la localización de los genes de la corea de Huntington, la distrofia miotónica, la ataxia espinocerebelosa, etc.

## Mapa de enfermedades

Las mutaciones presentes en el seno de un gen implican la existencia de dos alelos para el *locus* de este gen, uno correspondiente al estado patológico, y el otro, a la normalidad. Así pues, el estado patológico es un marcador del gen, pudiendo establecer ligamiento genético entre el *locus* para una enfermedad y el marcador de localización conocida en el genoma. El ligamiento genético permite localizar cromosómicamente una enfermedad determinada: corea de Huntington, poliquistosis renal del adulto, fibrosis quística, poliposis colónica familiar, melanoma, etc. (tabla 9.10).

El catálogo sobre la herencia mendeliana en el hombre (*Mendelian inheritance in man*) de VICTOR MCKUSICK proporciona información sobre las enfermedades y los defectos hereditarios observados en el hombre, detallando su localización cromosómica. El catálogo tiene en la actualidad más de 6.000 defectos hereditarios. La publicación del 12.º congreso sobre el Mapa del Genoma Humano (*Human Gene Mapping 12*) es de gran utilidad para la consulta sobre los *loci* patológicos y no patológicos del genoma, marcadores, RFLP, mini-satélites, microsatélites y alteraciones cromosómicas que se han descrito en el hombre (fig. 9.45).

Muchos defectos genéticos han sido "mapeados" conociendo el gen que se encuentra implicado en la enfermedad, mientras que en otros la localización se ha realizado de forma indirecta, utilizando marcadores ligados al defecto. Los métodos de mapeo empleados incluyen: hibridación *in situ*, híbridos somáticos, ligamiento genético o anomalías cromosómicas, utilizados de forma individual o combinada.



**Fig. 9.45.** Crecimiento de la información proporcionada por el Proyecto Genoma Humano. STS: unidades físicas de mapeo. (Modificada de CUTICCHIA AJ et al. *Science* 1993; 262: 47-48.)

**TABLA 9.10.** Principales *loci* de enfermedades humanas

Localización cromosómica	Símbolo	Proteína/patología	Enfermedad
1pter-p36.13	ENO1	Enolasa-1, $\alpha$	Déficit de enolasa
1p36.3-p34.1	C1QA,B	Complemento 1q $\alpha$ y $\beta$	Déficit C1q (?)
1p36.3-p36.2	PLOD	Procolágeno-lisina, 2-oxoglutarato-5-dioxigenasa	Síndrome de Ehlers-Danlos tipo VI
1p36.2-p36.1	NB	Neuroblastoma	Neuroblastoma
1p36.2-p34	EL1	Eliptocitosis 1 (proteína 4.1)	Eliptocitosis 1
1p36.2-p34	EKV	Eritroqueratodermia variable	Eritroqueratodermia variable
1p36.2-p34	RH	<i>Rhesus</i> sanguíneo	Eritroblastosis fetal
1p36.1-p34	ALPL	Fosfatasa alcalina	Hipofosfatasa infantil y del adulto
1p36	BRCD2	Cáncer de mama ductal	Cáncer de mama ductal
1p36-p35	GALE	UDP-galactosa-4-epimerasa	Déficit de galactosa-epimerasa
1p34	FUCA1	Fucosidasa, $\alpha$ -L-1	Fucosidosis
1p34	UROD	Uroporfirinógeno-descarboxilasa	Porfiria cutánea <i>tarda</i> , porfiria hepatoeritropoyética
1p32	C8A	Complemento 8 $\alpha$ y $\beta$	Déficit C8 tipos I y II
1p32	CLN1	Lipofuscinosis ceroida	Lipofuscinosis ceroida neuronal 1
1p32	TCL5	Leucemia/linfoma-5 de células T	Leucemia-1, aguda linfoblástica células T
1p31	ACADM	Acetil-CoA-deshidrogenasa cadena media	Déficit de acetil-CoA-deshidrogenasa
1p21	AGL	Amilo-1,6-glucosidasa, 4- $\alpha$ -glucanotransferasa	Glucogenosis III
1p13.1	HSD3B2	Hidroxi- $\delta$ -5-esteroide, deshidrogenasa, 3 $\beta$	Hiperplasia suprarenal II
1p13	TSHB	Hormona estimulante tiroidea $\beta$	Hipotiroidismo
1p13-p11	CPT1	Carnitina-palmitoiltransferasa	Miopatía debida a déficit de CTPasa
1cen-q32	PFKM	Fosfofructocinasa muscular	Glucogenosis VII
1q2	CAE	Cataratas, zonular pulverulenta	Cataratas, zonular pulverulenta
1q21	GBA	Glucosidasa $\beta$	Enfermedad de Gaucher
1q21	PKLR	Piruvatocinasa	Anemia hemolítica, déficit de piruvatocinasa
1q21.2q23	CMT1B, Po	Mielina Po	Charcot-Marie-Tooth, neuropatía tipo IB
1q23	F5	Factor V de la coagulación	Déficit de factor V de la coagulación
1q23	FCGR3	Fc-fragmento de IgG	Lupus eritematoso diseminado
1q23	PBX1	Factor 1 de transcripción	Leucemia aguda de células pre-B
1q23-q25	AT3	Antitrombina III	Déficit de antitrombina III, trombofilia
1q25	NCF2	Factor 2 citosólico de neutrófilos	Enfermedad granulomatosa crónica
1q31-q32.1	F13B	Factor XIII B de la coagulación	Déficit de factor XIII B
1q32	USH2	Síndrome de Usher-2	Síndrome de Usher tipo 2
1q32	VWS	Síndrome de Van der Woude	Síndrome de Van der Woude
2p25	POMC	Propiomelanocortina	Déficit de ACTH
2p24	APOB	Apolipoproteína B	Dislipemia, apolipoproteína B
2q13-q14	PROC	Proteína C	Déficit de proteína C, trombofilia
2q21	ERCC3, XPB	Tiolasa 3-oxoacil-CoA-peroxisómica	Xeroderma pigmentoso grupo B
2q31	COL3A1	Colágeno III, polipéptido $\alpha$ 1	Síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV; aneurisma familiar
2q33-q35	CRYG1	Cristalino, polipéptido 1 $\gamma$	Cataratas tipo Coppock
2q34	TCL4	Leucemia/linfoma-4 de células T	Leucemia/linfoma células T
2q34-q35	ACADL	Acetil-CoA-deshidrogenasa de cadena larga	Acetil-CoA-deshidrogenasa cadena larga
Chr.2	UGT1	IDP-glucuronosiltransferasa-1	Síndrome de Crigler-Najjar tipo I
3p26-p25	VHL	Síndrome de Von Hippel-Lindau	Síndrome de Von Hippel-Lindau
3p23-p22	ACAA	Tiolasa 3-oxoacil-CoA-peroxisómica	Síndrome de pseudo-Zellweger
3p23-p21	CLC1	Cáncer de pulmón de células pequeñas	Cáncer de pulmón de células pequeñas
3p21	COL7A1	Colágeno VII, $\alpha$ -1	Epidermolisis ampollar distrófica dominante y recesiva
3p21-p14.2	GLB1	Galactosidasa, $\beta$ -1	GM1-gangliosidosis; mucopolisacaridosis IVB
3p14.2	RCC1	Carcinoma de células renales	Carcinoma de células renales
3p11.1-q11.2	PROS1	Déficit de proteína S	Déficit de proteína S, trombofilia
3q11-q12	GPX1	Glutación-peroxidasa-1	Anemia hemolítica, déficit de glutación-peroxidasa-1
3q13	OPRT	Orotato-fosforribosiltransferasa	Aciduria órtica
3q21	TF	Transferrina	Atransferrinemia
3q21-q22	PCCB	Propionil-CoA-carboxilasa $\beta$	Acidemia propiónica tipo II
3q21-q24	CP	Ceruloplasmina	Hipoceruloplasminemia hereditaria
3q21-q24	FHH	Hipercalcemia hipocalciúrica familiar	Hipercalcemia-hipocalciúrica familiar
3q21-q24	RHO, RP4	Rodopsina	Retinitis pigmentaria, autosómica dominante
3q26.1-q26.2	BCHE	Seudocolinesterasa 1	Apnea postanestésica
4p16.3	HD	Huntingtina	Corea de Huntington
4p16.3	IDUA	$\alpha$ -L-iduronidasa	Síndrome de Hurler, mucopolisacaridosis 1
4q11-q13	AFP, HPAFP	Alfafetoproteína	Persistencia hereditaria de alfafetoproteína
4q11-q13	ALB	Albumina	Analbuminemia
4q11-q13	JPD	Periodontitis juvenil	Periodontitis juvenil
4q13-q21	DGI1	Dentinogénesis imperfecta-1	Dentinogénesis imperfecta 1
4q21-q23	GNPTA	N-acetil- $\alpha$ -glucosaminil-fosfotransferasa	Mucopolisacaridosis II y III
4q23-q27	AGA	Aspartilglucosaminidasa	Aspartilglucosaminuria
4q23-q27	RGS	Síndrome de Rieger	Síndrome de Rieger
4q25	IF	Complemento componente 1	Déficit inactivador C3b
4q26-q27	IL2, TCGF	Interleucina 2	Inmunodeficiencia grave combinada
4q28	FGA	Fibrinógeno	Disfibrinogenemia
4q31.1	MLR	Receptor mineralcorticoide	Seudohipoaldosteronismo
4q35	F11	Factor XI de la coagulación	Déficit de factor XI
4q35	FMD, FSHD	Distrofia muscular fascioescapulohumeral	Distrofia muscular fascioescapulohumeral
4q35	KLK3	Calicreína	Déficit de factor Fletcher
5p13	C6, C7, C9	Complemento, componentes 6, 7, 9	Déficit C6, C7, C9

(Continúa)



**TABLA 9.10.** Principales *loci* de enfermedades humanas (*continuación*)

Localización cromosómica	Símbolo	Proteína/patología	Enfermedad
5p13-p12	GHR	Receptor hormona crecimiento	Enanismo
5q11-q13	ARSB	Arlsulfatasa B	Síndrome de Maroteau-Lamy
5q11.2-q13.2	DHFR	Dihidrofolato-reductasa	Anemia megaloblástica por déficit de dihidrofolato-reductasa
5q12.2-q13.3	SMA	Atrofia muscular espinal	Enfermedad de Werdnig-Hoffmann, atrofia muscular espinal II y III
5q21	MCC	Mutado en cáncer colorrectal	Cáncer colorrectal
5q21-q22	APC, GS	Poliposis adenomatosa de colon Síndrome de Gardner	Síndrome de Gardner, poliposis colónica familiar Cáncer colorrectal
5q22.3-q31.3	LGMD1	Distrofia muscular <i>limb-girdle</i>	Distrofia muscular <i>limb-girdle</i> , autosómica dominante
5q31-q33	LFHL1	Sordera progresiva	Sordera
5q31-q34	DTD	Displasia distrófica	Displasia distrófica
5q33-qter	F12, HAF	Factor XII de la coagulación	Déficit de factor XII
Chr.5	FBN2	Fibrilina 2	Araconodactilia contractual congénita
Chr.5	GM2A	Proteína GM2-activadora	GM2-gangliosidosis, variante AB
6pter-p23	OFC, CL	Hendidura orofacial	Hendidura orofacial
6p25-p24	F13A1	Factor XIII A de la coagulación	Déficit de factor XIII A
6p21.3	C2, C4	Complemento C2, C4 $\alpha$ y $\beta$	Déficit C2, C4
6p21.3	CYP21	Citocromo P <sub>450</sub> esteroide 21-hidroxilasa	Hiperplasia suprarrenal congénita
6p21.3	EJM1	Epilepsia mioclónica juvenil	Epilepsia mioclónica juvenil
6p21.3	GLUR	Glucosuria renal	Glucosuria renal
6p21.3	HFE	Hemocromatosis	Hemocromatosis
6p21.3	PDB	Enfermedad de Paget	Enfermedad de Paget
6p21.3-p21.2	SCA1	Ataxina 1	Ataxia espinocerebelar tipo 1
6p21.1-cen	RDS	Degeneración retiniana (periferina)	Retinitis pigmentaria
6p21	MCM	Metilmalonil-CoA-mutasa	Aciduria metilmalónica-mutasa
6q13-q21	MCDR1	Distrofia macular de retina 1	Distrofia macular tipo 1
6q24-q27	ESR	Receptor de estrógeno	Cáncer de mama
6q26-q27	PLG	Plasminógeno	Déficit de plasminógeno, tipos I y II
6q27	LPA	Apolipoproteína Lp ( $\alpha$ )	Susceptibilidad a enfermedad coronaria
7p21.3-p21.2	CRS	Craneosinostosis	Craneosinostosis
7p13	GCPS	Greig, craneopolisindactilia	Craneopolisindactilia de Greig
7q11.23	NCF1	Factor 1 citosólico de neutrófilos	Enfermedad granulomatosa crónica (déficit de NCF-1)
7q11.23	ZWS1	Síndrome 1 de Zellweger	Síndrome 1 de Zellweger
7q21.11	GUSB	$\beta$ -glucuronidasa	Mucopolisacaridosis VII
7q21.3-q22	PLANH1	Inhibidor del activador del plasminógeno 1	Trombofilia, diátesis hemorrágica
7q21.3-q22.1	COLIA2	Colágeno I, $\alpha$ 2	Osteogénesis imperfecta, síndrome de Ehlers-Danlos, tipo VIIA2
7q31.2	CFTR, CF	Regulador de conducción transmembrana en la fibrosis quística	Fibrosis quística, agenesia congénita de vasos deferentes
7q36	HLP3	Holoprosencefalia tipo 3	Holoprosencefalia tipo 3
Chr.7	HADH	Hidroxiacil-CoA-deshidrogenasa	Déficit 3-hidroxiacil-CoA-deshidrogenasa
8p22	LPL	Lipoproteínlipasa (lipasa D)	Hiperlipoproteinemia I
8p21.1	GSR	Glutación-reductasa	Anemia hemolítica, déficit de glutación-reductasa
8p12	PLAT, TPA	Activador tisular del plasminógeno	Déficit de activador plasminógeno
8p12-p11	WRN	Síndrome de Werner	Síndrome de Werner
8p11-q21	RPI	Retinitis pigmentaria 1	Retinitis pigmentaria 1
8q21	CYP11B1, B2	Citocromo P450, XI $\beta$ 1, $\beta$ 2	Hiperplasia suprarrenal congénita, déficit de 11- $\beta$ -hidroxilasa
8q22	CA1, CA2	Anhidrasas carbónicas I y II	Déficit de anhidrasa I carbónica, acidosis tubular renal
8q24	EBS1	Epidermólisis ampollar simple 1 (Ogna)	Epidermólisis ampollar tipo Ogna
8q24.11-q24.13	LGCR	Síndrome de Langer-Giedion	Síndrome de Langer-Giedion
8q24.12	TRPS1	Síndrome tricorriñofalángico	Síndrome tricorriñofalángico tipo I
8q24.12-q24.13	MYC	Oncogén <i>myc</i>	Linfoma de Burkitt
8q24.2-q24.3	TG	Tiroglobulina	Hipotiroidismo hereditario congénito
8p22-p21	LALL	Leucemia linfoblástica aguda	Leucemia linfoblástica aguda
9p21	IFNA	Interferón $\alpha$	Déficit interferón $\alpha$
9p13	GALT	Galactosa-1-fosfato-uridiltransferasa	Galactosemia
9q13-q21.1	FRDA	Ataxia de Friedreich	Ataxia de Friedreich
9q22	ALDOB	Aldolasa $\beta$ -fructosa-bisfosfatasa	Intolerancia a la fructosa
9q31	BCNS	Síndrome de nevo basocelular	Síndrome de nevo basocelular (síndrome de Gorlin)
9q31	TAL2	Leucemia 2 linfoblástica aguda de células T	Leucemia 2 linfoblástica aguda de células T
9q32-q34	DYT1	Distonía de torsión	Distonía de torsión
9q33-q34	TSC1	Esclerosis tuberosa 1	Esclerosis tuberosa 1
9q34	ALAD	$\delta$ -aminolevulinato-deshidratasa	Porfiria hepática aguda
9q34.1	ABL	Oncogén <i>abl</i>	Leucemia mieloide crónica
9q34.1	C5	Complemento, componente 5	Déficit de C5
9q34.1	XPA	Xeroderma pigmentario A	Xeroderma pigmentario A
10p12-q23.2	GBM	Glioblastoma multiforme	Gioblastoma multiforme
10q21-q22	PSAP, SAP1	Prosaposina	Leucodistrofia metacromática
10q21.1	MEN2A, RET MEN2B	Oncogén <i>ret</i>	Neoplasia endocrina múltiple II A y II B Carcinoma medular de tiroides
10q21.1	HSCR, RET	Megacolon (Hirschsprung)	Megacolon (enfermedad de Hirschsprung)
10q24	HOX11, TCL3	<i>Homeo box</i> -11	Leucemia linfoblástica aguda de células T
10q25.2-q26.3	UROS	Uroporfirinógeno III-sintetasa	Porfiria congénita eritropoyética

(Continúa)



**TABLA 9.10.** Principales *loci* de enfermedades humanas (*continuación*)

Localización cromosómica	Símbolo	Proteína/patología	Enfermedad
Chr.10	CYP17	Citocromo P <sub>450</sub> , XVII	Hiperplasia suprarrenal V
11pter-p15.4	BWS	Síndrome de Beckwith-Wiedemann	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
11p15.5	ADCR	Carcinoma corticosuprarrenal	Carcinoma corticosuprarrenal
11p15.5	HBB	Hemoglobina β	Anemia de células falciformes, talasemia
11p15.5	LQT	Síndrome de QT largo	Síndrome del QT largo
11p15.5	MTACR1	Tumor de Wilms tipo 2	Tumor de Wilms tipo 2
11p15.5	RMS	Rabdomiosarcoma	Rabdomiosarcoma embrionario
11p15.4-15.1	SMPD1	Esfingomielinasa	Enfermedad de Niemann-Pick
11p15.3-p15.1	PTH	Hormona paratiroidea	Hipoparatiroidismo familiar
11p14-p13	CD59	Antígeno CD59 (p18-20)	Hemoglobinuria paroxística nocturna
11p13	GUD	Displasia genitourinaria	Displasia genitourinaria
11p13	PAX6, AN2	<i>Paired box</i> homeótico-6	Aniridia 2
11p13	TCL2	Leucemia/linfoma-2 de células T	Leucemia aguda de células T
11p13	WT1, WAGR	Tumor de Wilms 1	Tumor de Wilms, aniridia, síndrome WAGR, gonadoblastoma
11p11-q12	F2	Protrombina	Hipoprotrombinemia, disprotrombinemia
11q	PC	Piruvato-carboxilasa	Déficit de piruvato-carboxilasa
11q11-q13.1	CINH, C1I	Inhibidor de complemento C 1	Angioedema hereditario
11q12-q13	API-IGEL	Atopia	Atopia, asma alérgica, rinitis
11q13	MEN1	Neoplasia endocrina múltiple 1	Neoplasia endocrina múltiple tipo I
11q13	PYGM	Glucógeno-fosforilasa muscular	Enfermedad de McArdle
11q13.3	BCL1	LLC/linfoma-1 de células B	Leucemia/linfoma-1 de células B
11q14-q21	TyR, ATN	Tirosinasa	Albinismo (albinismo tirosinasa negativo)
11q22-q23	ATA-AT1	Ataxia-telangiectasia	Ataxia-telangiectasia
11q23	APOA1	Apolipoproteína AI	Déficit Apo AI y Apo CIII combinado
11q23	MLL	Leucemia mielóide/linfoide	Leucemia mielóide/linfoide
11q24.1-q24.2	PBGD, UPS	Porfobilinógeno-desaminasa	Porfiria aguda intermitente
Chr.11	GLAU1	Glaucoma 1 congénito	Glaucoma congénito
Chr.11	GIF	Factor gástrico intrínseco	Anemia perniciosa, déficit de factor intrínseco
12pter-p12	F8VWF	Factor VIII VWF de la coagulación	Enfermedad de Von Willebrand
12p13.3-p12.3	A2M	α <sub>2</sub> -macroglobulina	Enfisema debido a déficit de α <sub>2</sub> -macroglobulina
12p13	C1R	Complemento C1r	Déficit C1r/C1s
12p12.1	KRAS2	Oncogén <i>K-ras2</i>	Cáncer colorrectal
12q11-q13	KRT1	Queratina-1,α	Epidermolísis ampollar simple, hiperqueratosis epidermolítica
12q11-q13	KRT5	Queratina-5	Epidermolísis ampollar tipo Dowling-Meara
12q13-q14	BABL, LIPO	Lipoma	Lipoma liposarcoma mixoide
12q13.11-q13.2	COL2A1	Colágeno II α1	Síndrome de Stickle, displasia espondiloepifisaria congénita
12q22-qter	ACADS	Acetil-CoA-deshidrogenasa, cadena corta	Déficit de acil-CoA-deshidrogenasa cadena corta
12q24.1	PAH, PKU1	Fenilalanina-hidroxilasa	Fenilcetonuria, hiperfenilalaninemia
12q24.2	ALDH2	Aldehído-deshidrogenasa-2, mitocondrial	Intolerancia aguda al alcohol
13q14-q21	WND, WD	Enfermedad de Wilson	Enfermedad de Wilson
13q14.1	OSRC	Osteosarcoma	Osteosarcoma, retinoblastoma
13q14.1-q14.2	RB1	Retinoblastoma 1	Retinoblastoma
13q32	PCCA	Propionil-CoA-carboxilasa α	Acidemia propiónica tipo I
13q34	F7	Factor VII de la coagulación	Déficit de factor VII
13q34	F10	Factor X de la coagulación	Déficit de factor X
Chr.13	BRCD1	Cáncer de mama	Cáncer ductal de mama
14q	USH1A	Síndrome de Usher 1A	Síndrome de Usher tipo 1A
14q11.2	TCRA	Receptor antígeno células T	Leucemia/linfoma de células T
14q12	MYH7	Miosina cardíaca β	Miocardiopatía hipertrófica
14q21-q31	GALC	Galactocerebrosidasa	Enfermedad de Krabbe
14q22-q23.2	SPTB	Espectrina β	Eliptocitosis 3, esferocitosis 1
14q31	TSHR	Hormona estimulante del tiroides	Hipotiroidismo debido a resistencia TSH
14q32	VP, PPOX	Porfiria <i>variegata</i>	Porfiria <i>variegata</i>
14q32.1	AACT	α <sub>1</sub> -antiquimotripsina	Déficit α <sub>1</sub> -antiquimotripsina
14q32.1	PI, AAT	α <sub>1</sub> -antitripsina	Enfisema-cirrosis
14q32.1	TCL1	Linfoma-1 de células T	Leucemia/linfoma de células T
Chr.14	PYGL, PPYL	Glucógeno-fosforilasa hígado	Glucogenosis tipo VI
15q11	PWCR, PWS	Síndrome de Prader-Willi	Síndrome de Prader-Willi
15q15-q22	LGMD2	Distrofia muscular <i>limb-girdle</i>	Distrofia muscular <i>limb-girdle</i>
15q21-q22	B2M	β <sub>2</sub> -microglobulina	Hemodiálisis relacionada con amiloidosis
15q21.1	FBN1, FBN	Fibrilina 1	Síndrome de Marfan
15q22	PML	Leucemia promielocítica aguda	Leucemia promielocítica aguda
15q23-q24	HEXA, TSD	Hexosaminidasa A	Gangliosidosis GM2, Tay-Sachs
15q23-q25	FAH	Fumarilacetooetasa	Tiroxinemia tipo I
Chr.15	XPF	Xeroderma pigmentario grupo F	Xeroderma pigmentario tipo F
16pter-p13.3	HBA1	Hemoglobina α1	Talasemias α
16p13.31-p13.12	PKD1	Poliquistosis renal del adulto	Poliquistosis renal
16p13	MEF	Fiebre mediterránea familiar	Fiebre mediterránea familiar
16p13	TSC	Esclerosis tuberosa 2	Esclerosis tuberosa 2
16p12	CLN3, BTS	Lipofuscinosis ceróidea neuronal-3 juvenil (Batten)	Enfermedad de Batten
16q22.1	CTM	Cataratas tipo Marnier	Cataratas tipo Marnier
16q22.1-q22.3	TAT	Tirosina aminotransferasa	Tirosinemia tipo II

(Continúa)

**TABLA 9.10.** Principales *loci* de enfermedades humanas (*continuación*)

Localización cromosómica	Símbolo	Proteína/patología	Enfermedad
16q24	APRT	Adenina-fosforribosiltransferasa	Urolitiasis, 2,8-dihidroxiadenina
16q24	CYBA	Citocromo b-245, $\alpha$	Granulomatosis crónica autosómica, déficit de CYBA
17pter-p12	GP1BA	Glucoproteína Ib, $\alpha$	Síndrome de Bernard-Soulier
17pter-p12	PLI	Inhibidor de la plasmina $\alpha$ -2	Déficit de inhibidor de la plasmina
17p13.3	MDCR	Síndrome de Miller-Dieker, lisencefalia	Síndrome de Miller-Dieker lisencefálico
17p13.1	TP53	Proteína p53	Cáncer colorrectal, síndrome Li-Fraumeni
17p11.2	CMT1A, PMP22	Charcot-Marie-Tooth Ia	Neuropatía de Charcot-Marie-Tooth tipo Ia
17p11.2	SMCR	Síndrome de Smith-Magenis	Síndrome de Smith-Magenis
17q11-q12	EDH17B1	Estradiol 17- $\beta$ -deshidrogenasa-1	Seudohermafroditismo masculino, con ginecomastia, ovario poliquístico
17q11.2	NF1, VRNF	Neurofibromatosis tipo 1	Neurofibromatosis, Von Recklinghausen
17q11.2	WSS	Síndrome de Watson	Síndrome de Watson
17q12-q21	KRT14	Queratina 14	Epidermólisis ampollar simple
17q21	ACAC	Acetil-CoA-carboxilasa	Déficit de acetil-CoA-carboxilasa
17q21	BRCA1	Cáncer de mama-1, inicio precoz	Cáncer de mama-1, inicio precoz
17q21-q22	GALK	Galactocinasa	Déficit de galactocinasa
17q21-q22	KRT10	Queratina-10	Hiperqueratosis epidermolítica
17q21.1	RARA	Receptor ácido retinoico $\alpha$	Leucemia aguda promielocítica
17q21.3-q22	MPO	Mieloperoxidasa	Déficit de mieloperoxidasa
17q21.31-q22.05	COL1A1	Colágeno I, $\alpha$ 1	Osteogénesis imperfecta, síndrome de Ehlers-Danlos tipo VIIA1
17q21.32	ITGA2B, B3	Integrina $\alpha$ II $\beta$ 3	Trombastenia de Glanzmann tipo A, B
17q22-q24	CSH1	Somatomamotropina coriónica A	Déficit de lactógeno placentario
17q22-q24	GH1, GHN	Hormona de crecimiento	Déficit de hormona de crecimiento
17q23	GAA	Glucosidasa ácida $\alpha$	Enfermedad de Pompe; déficit de glucosidasa ácida $\alpha$
17q23.1-q25.3	SCN4A	Canal sodio 4 $\alpha$	Parálisis periódica hiperpotasémica
18q11-q12	LCFS2	Síndrome de Lynch	(?) Cáncer familiar síndrome II de Lynch
18q11.2-q12.1	TBPA	Transferrina	Neuropatía amiloidótica familiar
18q21.3	BCL2	LLC/linfoma-2 de células B	Linfoma-2 de células B
18q21.3	FECH	Ferroquelatasa	Protoporfiria eritropoyética
18q22.1	GTS	Síndrome de Gilles de la Tourette	(?) Síndrome de De la Tourette
18q23.3	DCC, CRC18	Cáncer colorrectal gen delecionado	Cáncer colorrectal
Chr. 18	CYB5	Citocromo b5	Metahemoglobinemia, déficit de citocromo b5
19p13.3-p13.2	C3	Complemento 3	Déficit C3
19p13.3-p13.2	NSR	Receptor de la insulina	Diabetes mellitus resistente a la insulina
19p13.3-p13.2	TCF3, E2A	Factor 3 transcripción	Leucemia linfoblástica aguda
19p13.2-p13.1	LDLr, FHC	Hipercolesterolemia familiar (receptor LDL)	Hipercolesterolemia familiar
19p13.1	RFX1	Factor regulación 1 (HLA clase II)	Inmunodeficiencia grave combinada
19p13	LYL1	Leucemia linfoide-1	Leucemia linfoblástica aguda de células T
19q13	BCL3	LLC/linfoma-3 células B	Leucemia/linfoma-3 de células B
19q13.1	APOE	Apolipoproteína E	Hiperlipoproteinemia, tipo III
19q13.1	APOC2	Apolipoproteína CII	Hiperlipoproteinemia, tipo Ib
19q13.1	RYR1	Receptor rianodina	Hipertermia maligna
19q13.2-q13.3	DM	Distrofia miotónica	Distrofia miotónica
19q13.2-q13.3	ERCC2	Escisión reparación, complementación	Xeroderma pigmentario, grupo D
19q13.3	LIG1	DNA-ligasa 1	Déficit de DNA-ligasa
19q13.32	LHB	Hormona luteinizante $\beta$	Hipogonadismo hipergonadotrófico
Chr. 19	ETFB	Flavoproteína transferidora de electrones $\beta$	Glutaricaciduria, tipo IIc
20pter-p12.21	ARVP, VP	Arginina vasopresina-neurofisina II	Diabetes insípida neurohipofisaria
20pter-p12	PRNP, PRIP	Proteína prión (p27-30)	Creutzfeldt-Jakob, Gerstmann-Strausler
20p11.2	AGS, AHD	Síndrome de Alagille	Síndrome de Alagille
20p11	CST3	Cistatina C	Angiopatia cerebral amiloidótica
20q13	MODY1	Diabetes juvenil tipo I	Diabetes juvenil tipo I
20q13.1	PPGB	Proteína protectora para $\beta$ -galactosidasa	Galactosialidosis
20q13.11	ADA	Adenosindesaminasa	Inmunodeficiencia grave combinada
20q13.2	GNAS1	Proteína de unión de guanina	Seudohipoparatiroidismo tipo Ia
20q13.2-q13.3	EBN, BNS	Epilepsia benigna neonatal	Epilepsia benigna neonatal
20q13.2-q13.3	FA, FA1	Anemia de Fanconi 1	Anemia de Fanconi 1
21q21.3-q22.05	APP	Proteína (A4) precursora $\beta$ -amiloide	Amiloidosis cerebroarterial tipo holandés; enfermedad de Alzheimer
21q22	AML1	Leucemia mieloide aguda	Leucemia mieloide aguda
21q22-q22.2	ALS1, SOD1	Esclerosis lateral amiotrófica 1	Esclerosis lateral amiotrófica
21q22.3	CBS	Cistationina $\beta$ -sintetasa	Homocistinuria con respuesta a B <sub>6</sub>
21q22.3	EPM1	Epilepsia progresiva mioclónica 1	Epilepsia progresiva mioclónica
21q22.3	ITGB2	Integrina $\beta$ -2	Déficit de adhesión de leucocitos
21q22.3	PFKL	Fosfofructocinasa hepática	Anemia hemolítica debida a déficit de fosfofructocinasa
22q11	CECR	Síndrome de ojo de gato	Síndrome de ojo de gato
22q11	DGCR, DGS	Síndrome de DiGeorge	Síndrome de DiGeorge
22q11	HCF2, HC2	Cofactor II de la heparina	Trombofilia debida a déficit de cofactor heparina
22q11	VCFS	Síndrome velocardiofacial	Síndrome velocardiofacial
22q11.1-q11.2	GGT2, GTG	$\gamma$ -glutamiltanspeptidasa-2	Glutacioninuria
22q11.2-qter	TCN2	Transcobalamina II	Déficit de transcobalamina II
22q11.21	BCR, CML	Breakpoint cluster region	Leucemia mieloide crónica
22q11.21-q13.1	NF2, ACN	Neurofibromatosis 2	Neurofibromatosis 2

(Continúa)

**TABLA 9.10.** Principales *loci* de enfermedades humanas (*continuación*)

Localización cromosómica	Símbolo	Proteína/patología	Enfermedad
22q12	ES	Sarcoma de Ewing (neuroepitelioma)	Sarcoma de Ewing, neuroepitelioma
22q12.3-qter	MGCR	Meningioma	Meningioma
22q13.1	ADSL	Adenilsuccinasa	Déficit de adenilsuccinasa
22q13.31-qter	ARSA	Arilsulfatasa A	Leucodistrofia metacromática
22q13.31-qter	DIA1	NADH-diaforasa-1	Metahemoglobinemia enzimopática
Xpter-21	CSF2RA	Receptor factor-2 estimulante de colonias	Leucemia mieloide aguda tipo M2
Xp22.31	STS	Sulfatasa esteroide microsomal	Ictiosis, déficit de sulfatasa esteroide
Xp22.31	DHOF	Hipoplasia dérmica focal	Hipoplasia dérmica focal
Xp22.3	CDPX1	Condrodisplasia <i>punctata</i>	Condrodisplasia <i>punctata</i>
Xp22.3	KAL	Síndrome de Kallmann	Síndrome de Kallmann
Xp22.3	OA1	Albinismo ocular tipo 1	Albinismo ocular
Xp22.3-p22.1	AMELX	Amelogenina	Amelogénesis imperfecta
Xp22.3-p21.1	NHS	Síndrome catarata dentaria de Nance-Horan	Síndrome de Nance-Horan
Xp22.3-p22.1	RS	Retinosquiasis	Retinosquiasis
Xp22.2	CMTX2	Charcot-Marie-Tooth X2	Neuropatía de Charcot-Marie-Tooth
Xp22.2-p21.2	KFSD	Queratosis folicular espinulosa	Queratosis folicular espinulosa
Xp22.2-p22.1	CLS	Síndrome de Coffin-Lowry	Síndrome de Coffin-Lowry
Xp22.2-p22.1	HYP	Hipofosfatemia hereditaria	Hipofosfatemia hereditaria
Xp22.2-p22.1	MRSXS1	Retraso mental con epilepsia	Retraso mental con epilepsia
Xp22.2-p22.1	PDHA1	Piruvato-deshidrogenasa	Déficit de piruvato-deshidrogenasa
Xp22.2-p22.1	PAK	Fosforilasacinasa	Glucogenosis hepática tipo VII
Xp22	AGMX2	Agammaglobulinemia X2	Agammaglobulinemia tipo 2
Xp22	AIC	Síndrome de Aicardi	Síndrome de Aicardi
Xp22	GY	Hipofosfatemia hereditaria	Hipofosfatemia con sordera
Xp22	HOMG	Hipomagnesemia ligada al cromosoma X	Hipomagnesemia primaria ligada al cromosoma X
Xp22	MRX1	Retraso mental X1	Retraso mental X1
Xp22	SEDL	Displasia espondiloepifisaria	Displasia espondiloepifisaria tardía
Xp22-p21	GDXY	Disgenesia gonadal XI	Disgenesia gonadal XI, tipo mujer
Xp21.3-p21.1	RP3	Retinitis pigmentaria 3	Retinitis pigmentaria 3
Xp21.3-p21.2	AHC, AHX	Hipoplasia suprarrenal primaria	Hipoplasia suprarrenal primaria
Xp21.3-p21.2	GK	Glicerolcinasa	Déficit de glicerolcinasa
Xp21.2	DMD, BMD	Distrofia	Distrofia muscular de Duchenne-Becker
Xp21.1	CYBB, CGD	Enfermedad granulomatosa crónica	Enfermedad granulomatosa crónica
Xp21.1-p11.3	COD1	Distrofia progresiva de conos	Distrofia progresiva de conos
Xp21.1-q22	MRXS6	Retraso mental X6 con ginecomastia y obesidad	Retraso mental X6 con ginecomastia y obesidad
Xp21-p11	THC	Trombocitopenia	Trombocitopenia
Xp11.4	NDP, ND	Enfermedad de Norrie	Enfermedad de Norrie
Xp11.4-p11.23	PFC	Properdina, factor P	Déficit de properdina
Xp11.3	RP2	Retinitis pigmentaria-2	Retinitis pigmentaria-2
Xp11.3-p11.2	WAS, IMD2	Síndrome de Wiscott-Aldrich	Síndrome de Wiskott-Aldrich
Xp11.21	ALAS2, ASB	Aminolevulinato $\delta$ -sintetasa 2	Anemia sideroblástica
Xp11.21	IP1, IP	Incontinencia pigmentaria	Incontinencia pigmentaria
Xp11.2	SSCR	Sarcoma sinovial	Sarcoma sinovial
Xp11-q11	AIED, OA2	Albinismo ocular tipo Forsius-Eriksson	Albinismo ocular tipo Forsius-Eriksson
Xp11-q21	MRXS2	Retraso mental S2	Retraso mental S2 con dismorfismo y atrofia cerebral
Xp11-q21.3	MRXS3	Retraso mental XS3	Retraso mental XS3 con doblejía espástica
X-cen-q22	AR	Receptor androgénico	Feminización testicular, síndrome de Reifenstein
Xq11-q12	MRX2	Retraso mental X2	Retraso mental X2 no dismórfico
Xq12-q13	MNK-MK	Menkes	Síndrome de Menkes
Xq12-q21.1	DIT3	Distonía de torsión tipo filipino	Distonía de torsión-parkinsonismo tipo filipino
Xq12.2-13.1	EDA, HED	Ectodermia anhidrótica	Displasia ectodérmica anhidrótica
Xq13	CMTX1	Charcot-Marie-Tooth X1	Charcot-Marie-Tooth X1
Xq13	PGK1	Fosfogliceratocinasa 1	Anemia hemolítica debida a déficit de piruvatocinasa
Xq13-q21	WWS	Síndrome de Wieacker-Wolff	Síndrome de Wieacker-Wolff
Xq13-q21.31	CPX	Paladar hendido	Paladar hendido y labio leporino
Xq13-q22	MRXS4	Retraso mental XS4	Retraso mental XS4 con contractura congénita
Xq13.1	RPS4X	Proteína ribosómica S4	Síndrome de Turner
Xq13.1-q21.1	SCIDX1	Inmunodeficiencia grave combinada	Inmunodeficiencia grave combinada
Xq21-q22	SPG2	Paraplejía espástica	Paraplejía espástica
Xq21.2	CHM, TCD	Coroideremia	Coroideremia
Xq21.3-q22	AGMX1	Agammaglobulinemia tipo 1 (Bruton)	Agammaglobulinemia tipo 1 (Bruton)
Xq21.3-q22	MGC1	Megalocórnea	Megalocórnea
Xq22	COL4A5	Colágeno IV $\alpha 5$	Síndrome de Alport
Xq22	GLA	Galactosidasa $\alpha$	Enfermedad de Fabry
Xq22	PLP, PMD	Proteína proteolípídica	Enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher
Xq24-q27	HIGM1	Inmunodeficiencia con hiper-IgM	Inmunodeficiencia con hiper-IgM
Xq25	LYP, IMD5	Síndrome linfoproliferativo	Síndrome linfoproliferativo
Xq25-q27	PGS	Retraso mental, síndrome de Pettigrew	Retraso mental XS5 con malformación Dandy-Walwer
Xq26-q27	BFLS	Síndrome de Börjeson-Forsman-Lehmann	Síndrome de Börjeson-Forsman-Lehmann
Xq26-q27	HPT, HPTX	Hipoparatiroidismo	Hipoparatiroidismo
Xq26-q27	POF1, POF	Fallo ovárico prematuro	Fallo ovárico prematuro
Xq26-q27.2	HPRT	Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa	Síndrome de Lesch-Nyhan
Xq26.1	OCLR	Síndrome oculocerebrorenal de Lowe	Síndrome de Lowe
Xq26.3-q27.1	ADFN	Sordera-albinismo	Sordera-albinismo
Xq27-q28	IP2	Incontinencia pigmentaria 2	Incontinencia pigmentaria familiar
Xq27.1-q27.2	F9, HEMB	Factor IX de la coagulación	Hemofilia B

(Continúa)

**TABLA 9.10.** Principales *loci* de enfermedades humanas (*continuación*)

Localización cromosómica	Símbolo	Proteína/patología	Enfermedad
Xq27.3	FRAXA	FMR1, síndrome de Martin-Bell	Retraso mental ligado al cromosoma X frágil
Xq28	CBBM, BCM	Daltonismo monocromático azul	Daltonismo monocromático azul
Xq28	CDPX2	Condrodisplasia <i>punctata</i>	Condrodisplasia <i>punctata</i> , síndrome de Happle
Xq28	DIR, DI1	Diabetes insípida nefrogénica	Diabetes insípida nefrogénica
Xq28	DKC	Disqueratosis congénita	Disqueratosis congénita
Xq28	EFE2, BTHS	Fibroelastosis 2 endocárdica	Fibroelastosis 2 endocárdica, síndrome de Bart
Xq28	EMD	Distrofia muscular Emery-Dreifuss	Distrofia muscular Emery-Dreifuss
Xq28	F8C, HEMA	Factor VIII de la coagulación	Hemofilia A
Xq28	G6PD	Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa	Déficit glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa
Xq28	HSAS1	Hidrocefalia	Hidrocefalia por estenosis del acueducto de Silvio
Xq28	IDS, MPS2	Sulfoiduronato-sulfatasa	Mucopolisacaridosis II, síndrome de Hunter
Xq28	MASA	Síndrome MASA	Síndrome MASA, paraplejía espástica
Xq28	MRSD	Retraso mental con displasia esquelética X3	Retraso mental y displasia esquelética
Xq28	MTM1	Miopatía miotubular	Miopatía miotubular
Xq28	MIP1	Miopía 1	Miopía 1
Xq28	OPD1	Síndrome otopalatodigital tipo I	Síndrome otopalatodigital tipo I
Xq28	TKC, TKCR	Síndrome Goeminne TKCR	Síndrome Goeminne TKCR
Xq28	WSN	Síndrome de Waisman	Síndrome de parkinsonismo con retraso mental de Waisman

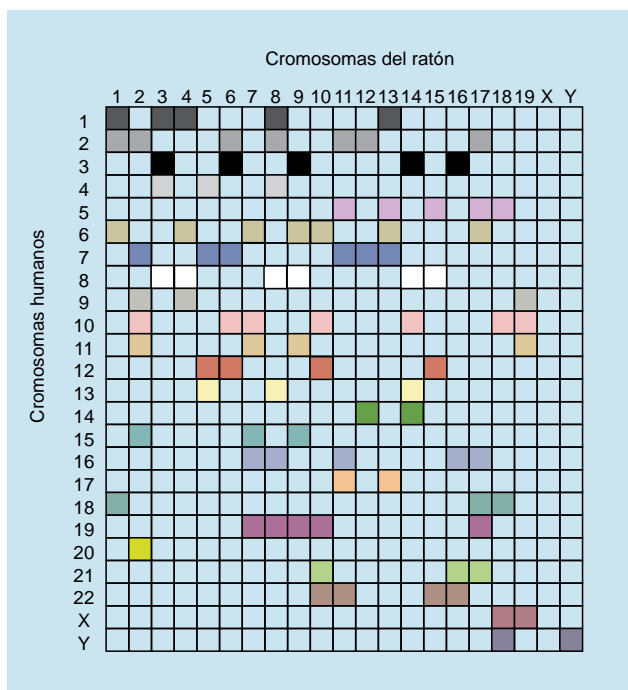
Los aspectos clínicos del mapa genético del hombre despiertan un creciente interés desde los distintos campos de la investigación biomédica. Se ha efectuado el mapeo de los genes relacionados con las enfermedades hereditarias más graves y muchos de ellos ya han sido identificados y aislados, siendo posible estudiar su patología molecular. La información sobre los aspectos clínicos asociados a *loci* específicos tiene gran relevancia para las aplicaciones diagnósticas y para el estudio de la función de los distintos genes.

En los últimos años ha habido un creciente interés en el estudio comparativo de los genomas de distintas especies y el humano. En la actualidad existen datos de mapeo comparativo para más de 25 especies de mamíferos. Este tipo de estudios reviste gran importancia para el avance en el mapa del genoma humano, ya que puede proporcionar una extra-

ordinaria información sobre la estructura del genoma y sobre el proceso evolutivo que lo ha generado. El mapa comparativo entre distintas especies facilitará el análisis del genoma humano y ayudará a comprender mejor la evolución del hombre. La distribución cromosómica de los genes homólogos puede ser de gran ayuda para comprender la organización genómica y la evolución de los cromosomas. El orden de genes en el cromosoma X se ha alterado en varias ocasiones en la evolución, debido a inversiones cromosómicas principalmente. En los autosomas los segmentos conservados sugieren que han sucedido más de 138 cambios desde la divergencia entre el hombre y el ratón.

El ratón ha sido uno de los principales organismos para estudios genéticos, ya que el periodo de gestación es muy corto y es posible controlar los apareamientos. Para la mayoría de las enfermedades hereditarias el ratón ha constituido el modelo de estudio más empleado. En los últimos años, el desarrollo de animales transgénicos ha permitido expresar prácticamente en cualquier tejido el gen de interés y crear mutaciones de distinto tipo. La posibilidad de introducir YAC en las células germinales del ratón abre la posibilidad de producir modelos animales para cualquier enfermedad humana.

De este modo, el interés en el mapa genético del ratón tiene una gran relevancia para el mapa genético del hombre. En la actualidad, de los 2.616 *loci* del ratón conocidos, 917 ya



**Fig. 9.46.** Localización de genes homólogos entre el hombre y el ratón. Cada cuadrado con un patrón indica al menos un locus que ha sido "mapeado" para el cromosoma correspondiente en el ratón y en el hombre. (Modificada de COPELAND NG et al. *Science* 1993; 262: 57-63.)

**TABLA 9.11.** Principales *clusters* de genes y localización cromosómica

Localización	Nombre de los genes	Símbolo
1q21	Histonas	H1F2, H3F2, H4F2
2p12	Inmunoglobulina K	IGKC, IGKV
2q12-q21	Interleucina 1	IL1A, IL1B
4Q21-Q23	Alcohol-deshidrogenasa	ADH1, ADH2, ADH3, ADH4
4q28	Fibrinógeno	FGA, FGB, FGG
5q23-31	Interleucinas 3, 4 y 5	IL3, IL4, IL5
6p21.3	HLA	HLA clases I, II y III
11p15.5	Hemoglobinas $\beta$ , $\delta$ , $\epsilon$ , $\gamma$	HBB, HBD, HBE1, HBG1, HBG2
11q23-qter	Apolipoproteínas	A1, C3, A4, APOA1, APOA4, APOC3
12p13.2	Proteína rica en prolina	PRB1-4, PRH1, PRH2
14q32.33	Inmunoglobulinas H	IGHA, A, D, E, G, M, V
16p13.3	Hemoglobinas $\alpha$ , $\zeta$	HBA, HBQ, HBZ
17pter-p11	Miosina, cadena pesada	MYH3, MYH4
19q13.2	Apolipoproteínas C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub> , E	APOC1, APOC2, APOE
22q11	Breakpoint cluster region	BCR
22q11.1-11.2	Inmunoglobulinas L	IGLC, IGLV



han sido localizados en el genoma del hombre. Estos *loci* marcan unos 100 segmentos de homología conservada entre el ratón y el hombre. Por ejemplo, el cromosoma humano 17 tiene 8 *loci* que se encuentran en el cromosoma 11 del ratón; el brazo corto del cromosoma humano 6 tiene más de 10 *loci* homólogos situados en el cromosoma 17 del ratón. La asignación de genes en el ratón permite conocer de forma inmediata su localización en el hombre. Los datos comparativos pueden ser de gran ayuda para dilucidar las bases genéticas de enfermedades como la trisomía 21 en el hombre; en el ratón, sin embargo, la trisomía del cromosoma 16 no constituye un modelo completo de las alteraciones del síndrome de Down, ya que varios de los *loci* implicados en esta enfermedad se encuentran situados en los cromosomas 10 y 17 además del cromosoma 16 del ratón (fig. 9.46).

El conocimiento del mapa genético ha permitido demostrar la presencia de genes que se encuentran agrupados en determinadas zonas, o *clusters*, los cuales tienen relaciones estructurales y funcionales entre sí. La tabla 9.11 indica los *clusters* de genes que se han descrito. El término *familias de genes* se destina a aquellos que guardan una relación estructural entre sí, con un origen evolutivo común, como serían los genes de la  $\alpha$ -globina y los de la  $\beta$ -globina.

## Proyecto Genoma Humano

El Proyecto Genoma Humano es un esfuerzo internacional para desarrollar mapas genéticos y físicos y determinar la secuencia de DNA del genoma humano y de los genomas de otros organismos. El proyecto se inició en 1990 y pretende conseguir su objetivo en unos 15 años. Los esfuerzos principales de dicho proyecto se están desarrollando en EE.UU., Francia, Gran Bretaña y Japón. Otros países participan en el proyecto, ya sea de forma parcial, con apoyo oficial de los propios gobiernos o por iniciativa individual de los investigadores en países para los que no existe el Proyecto Genoma.

Desde el inicio del proyecto hasta la actualidad se han producido considerables avances tecnológicos, los cuales son determinantes para el desarrollo del proyecto. Entre estos avances debe destacarse: *a)* nuevos tipos de marcadores (microsatélites) que se analizan de forma fácil mediante PCR; *b)* vectores que permiten aislar fragmentos de DNA de gran tamaño (YAC) para el desarrollo de mapas físicos; *c)* la definición de los STS como unidades físicas de mapeo, y *d)* nueva tecnología para la secuenciación del DNA. Estos avances han sido de gran relevancia, aunque se consideran insuficientes para conseguir el objetivo final del proyecto.

Los objetivos del Proyecto Genoma para los próximos 5 años son los siguientes: *a)* desarrollar un mapa genético de 2 cM por marcador, obteniendo marcadores más fáciles de analizar y sistemas de análisis más rápidos; *b)* obtener marcadores STS situados cada 100 kb; *c)* desarrollar sistemas para secuenciar varias megabases de DNA humano de especial interés médico y conseguir tecnología para secuenciar unas 50 Mb al año; *d)* desarrollar métodos para identificar y localizar genes conocidos en el mapa físico del genoma; *e)* desarrollar la tecnología del DNA; *f)* acelerar el estudio de modelos animales, incluyendo *Drosophila*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Caenorhabditis elegans*; *g)* desarrollar bases de datos adecuadas para el intercambio de información y desarrollar herramientas para interpretar la información generada; *h)* estudiar los aspectos éticos, legales y

sociales del Proyecto Genoma, e *i)* favorecer la formación de científicos en el campo de la investigación sobre el genoma.

Existen tres bases de datos de gran relevancia para el Proyecto Genoma Humano. En estas bases de datos se almacena información sobre DNA (*GenBank*), sobre el mapeo de cromosomas (*Genome Data Base*) e información sobre proteínas (*Protein Information Resource*). El acceso a estas bases de datos es esencial para la investigación y sus aplicaciones en el marco del Proyecto Genoma. La información generada ha crecido de forma espectacular en los últimos años, además de producirse con extraordinaria rapidez, estando desfasada la mayoría de la información escrita que se genera en las publicaciones científicas. El progreso que se está generando en el Proyecto Genoma debe conducir prácticamente a la desaparición de la información en forma de revistas científicas, salvo con finalidades exclusivamente lúdicas o de divulgación entre científicos ajenos al campo de investigación. De este modo, las bases de datos serán el medio adecuado para la comunicación de los avances científicos.

A pesar del enorme debate que el Proyecto Genoma generó en sus inicios, se acepta de forma mayoritaria que el conocimiento sobre el DNA proporcionará una información de enorme peso biológico, la cual no podría obtenerse por otras vías. La utilidad potencial del mapeo/secuenciación del genoma humano no sólo tiene interés desde el punto de vista de las enfermedades hereditarias y del cáncer, sino que su utilidad se centra en la mejor comprensión sobre las enfermedades multifactoriales, entre las que se encuentran la mayoría de los procesos comunes que afectan al hombre: la hipertensión, la aterosclerosis, las enfermedades mentales y las malformaciones congénitas.

El Proyecto Genoma ya ha generado importantes frutos con la identificación de los genes de la neurofibromatosis tipos 1 y 2, la corea de Huntington, la distrofia miotónica, la poliposis colónica familiar y el síndrome del cromosoma X frágil, entre otros. Por otra parte, ya se han localizado en cromosomas específicos los genes de procesos muy frecuentes, como el cáncer de mama, el cáncer de colon, la hipertensión, la diabetes y la enfermedad de Alzheimer. Es de esperar que la mayoría de los genes implicados en enfermedades humanas podrán ser identificados en el curso de la presente década.

### Bibliografía especial

- BOTSTEIN D, WHITE RL, SKOLNICK M, DAVIS RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1980; 32: 314-331.
- COLLINS FS. Positional cloning: let's not call it reverse anymore. *Nat Genet* 1992; 1: 3-6.
- CHUMAKOV I, RIGAUT P, GUILLOU S, OUGEN P, BILLAUT A, GUASCONI G et al. Continuum of overlapping clones spanning the entire human chromosome 21q. *Nat Genet* 1992; 359: 380-387.
- McKUSICK VA. Mendelian inheritance in man. Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes, 10.<sup>a</sup> ed. Baltimore, Johns Hopkins University Press, 1992.
- VAN OMMEN GJB, VERKERK JMH. Restriction analysis of chromosomal DNA in a size range up to two million base pairs by pulsed field gradient electrophoresis. En: DAVIES KE, ed. Human genetic diseases. A practical approach. Oxford, Washington DC, IRL Press, 1986; 113-133.
- WEISSENBACH J, GYAPAY G, DIB C, VIGNAL A, MORISSETTE J, MILLASSEAU P et al. A second generation linkage map of the human genome 1see comments. *Nature* 1992; 359: 794-801.



# Consejo genético y diagnóstico

V. Volpini Bertrán y X. Estivill Pallejà

A medida que se avanza en el conocimiento de las distintas afecciones de origen genético, una proporción considerablemente mayor de la población puede beneficiarse de los avances en el diagnóstico médico y del consejo genético. Estas facilidades asistenciales no dependen sólo de los progresos realizados, sino que son también el resultado del mejor nivel económico y social y de la capacidad de incorporar los avances en el campo de la medicina. Gran parte de la patología hereditaria y congénita es rara o muy rara, de modo que el médico de cabecera e incluso el especialista nunca ve un cuadro determinado ni es capaz de reconocerlo cuando se encuentra ante él. En algunos países, la especialidad de genética clínica o médica se ha desarrollado plenamente y los pacientes son remitidos cada vez más a las clínicas genéticas. Por otra parte, los avances en el diagnóstico molecular han permitido la creación de laboratorios especializados en genética molecular que disponen de la tecnología adecuada y de la posibilidad de incorporar con rapidez nuevos métodos diagnósticos. Por desgracia, éste no es el caso de muchos países, en los que la especialidad de genética médica no existe y se dispone de escasos facultativos y centros que ofrezcan un diagnóstico clínico y molecular adecuado a la población.

Los objetivos del consejo genético son informar a los posibles padres de la probabilidad de recurrencia de una anomalía genética o congénita, aconsejar a un individuo cuando existe un factor indicativo de riesgo en la historia familiar, diagnosticar de forma precoz ciertos procesos y facilitar el diagnóstico prenatal de las enfermedades hereditarias. La experiencia de los países con tradición en el consejo genético sugiere que éste debería realizarse en centros de genética, dirigidos por un genetista clínico experto, con personal médico especializado y con distintas áreas de análisis genético o con acceso a laboratorios de referencia. En los países desarrollados se tiende cada vez más a una mayor especialización de las clínicas genéticas, ofreciendo asistencia en campos como la oftalmología, la neurología y la dermatología. La falta de formación especializada suficiente y la ausencia de cauces sanitarios oportunos provocan que, en demasiadas ocasiones, el asesoramiento genético lo realicen profesionales inadecuadamente instruidos. Ello puede generar efectos psicológicos devastadores en individuos de genealogías con enfermedades hereditarias.

---

## Consejo genético

---

Cuando una enfermedad genética se diagnostica por primera vez en un individuo, éste se convierte en el *caso índice*, *propósito* o *probando*. Dicha circunstancia obliga a estudiar la genealogía relacionada con dicho individuo, con objeto de investigar la transmisión de la enfermedad y dilucidar la presencia de otros afectados.

El *consejo genético* es un acto médico complejo, por el que se informa al individuo consultante sobre la enfermedad, su modo de herencia y los riesgos de padecerla y/o transmitirla a su descendencia, ofreciéndole soluciones y apoyo. El consejo genético requiere que se establezca un *diagnóstico preciso en el caso índice*, coordinando la acción de diversos especialistas, familiarizados con las distintas entidades nosológicas. En muchas ocasiones es necesario un estudio citogenético y/o molecular. De este modo, actualmente es posible diagnosticar muchas enfermedades mono-

génicas con la detección de una mutación según las técnicas de la genética molecular, aclarándose diagnósticos hasta el presente inciertos (como casos sospechosos de distrofia muscular de Becker o distrofias de cinturas, en las que se detecta una alteración en el gen de la distrofia muscular de Duchenne-Becker). En las enfermedades en las que no es posible identificar la mutación, el consejo genético que resulta depende del diagnóstico correcto efectuado en el caso índice.

El consejo genético debe realizarse de forma individual y en una entrevista personal, cuidando mucho los aspectos psicológicos inherentes a la situación y su confidencialidad. Deben explicarse veraz e inteligiblemente los resultados obtenidos en los diversos estudios y las opciones frente a ellos, que ayuden al consultante a asumirlos y en la *toma de decisiones* respecto a una planificación familiar adecuada, según sus propios valores y criterios personales. Debe adjuntarse un informe escrito, aclarando todas las dudas que éste suscite. El genetista evitará opiniones personales o dirigismos, siendo más un acto de *asesoramiento* que de consejo, lo que hace más adecuado el empleo del primer término, situación que parece felizmente extenderse.

En el ámbito del asesoramiento se incluye la realización de una serie de *diagnósticos genéticos*, distintos al diagnóstico de la entidad clínica como tal. Se trata de averiguar si un individuo determinado de la genealogía ha heredado alteraciones en su material hereditario, que en el caso del probando se ha transformado en enfermedad. En las enfermedades con expresión citogenética, será este tipo de análisis el que revelará el estado de portador de una alteración determinada del número o de la estructura de los cromosomas. Si se trata de una enfermedad con herencia mendeliana simple (monogénica), se abordará según la tecnología genético-molecular. En este sentido, se habla de diagnóstico presintomático, de portadores, prenatal y de preimplantación. En muchas ocasiones estos diagnósticos se expresan según cifras de probabilidad de heredar o haber heredado una determinada característica genética deletérea.

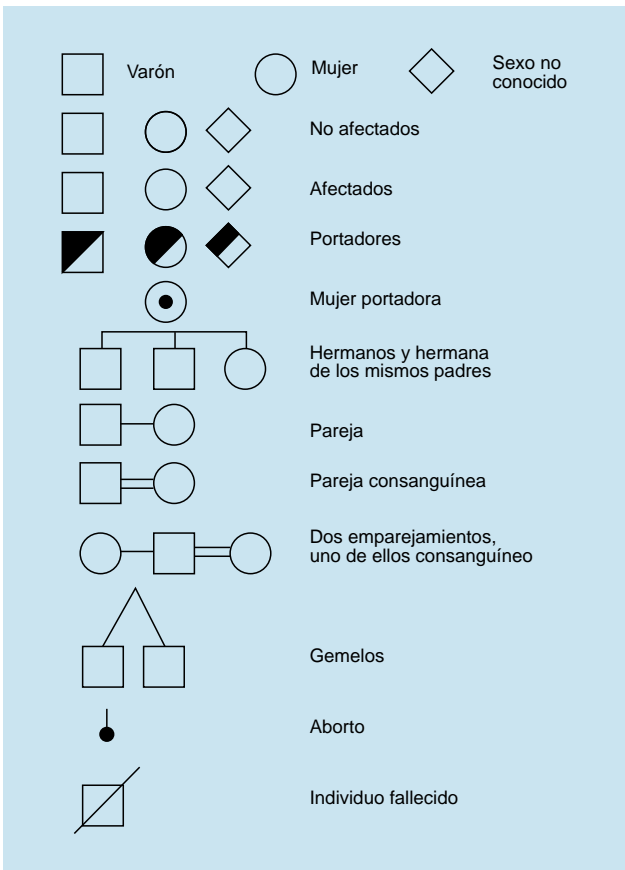
---

## Historia familiar

---

El estudio de la genealogía relacionada con el caso índice es indispensable en las enfermedades genéticas. Es importante la investigación de otros casos de afectación, la comprobación del modo de herencia y la revisión clínica de los individuos relacionados, con objeto de demostrar signos y síntomas del proceso en estudio (fenotipificación). Asimismo se deben recabar datos sobre consanguinidad, área o región de procedencia de los individuos y etnias. Debe disponerse también de historias clínicas resumidas de los miembros de la genealogía, con datos de filiación, edad de nacimiento, enfermedades padecidas y, en su caso, edad y causa de la defunción.

Las edades de inicio de los primeros signos o síntomas de la enfermedad son cruciales en los casos de herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta. De esta manera pueden obtenerse datos imprescindibles para los cálculos de riesgo. En las mujeres reviste especial interés obtener los datos obstétricos y ginecológicos (número y características de los embarazos, abortos, etc.). Se tendrán en cuenta las posibles falsas paternidades, que en la actualidad pueden determinarse fácilmente mediante el análisis molecular. Sobre este último aspecto debe explicarse que bajo ningún concepto se faltará a la confidencialidad de los resultados, que



**Fig. 9.47.** Símbolos utilizados con mayor frecuencia en las genealogías.

sólo serán revelados al consultante implicado (siempre según el criterio del asesor genético, si entran en conflicto con la herencia de la enfermedad en estudio).

Las genealogías se representan gráficamente en forma de *árbol genealógico*, siguiendo una simbología ampliamente aceptada (fig. 9.47). Las distintas generaciones se especifican en el margen izquierdo con números romanos, comenzando por la más antigua (I, II, III, etc.). En las generaciones paternas sin antepasados, los varones se sitúan a la izquierda. En las generaciones filiales los descendientes se sitúan de izquierda a derecha según los sucesivos nacimientos, numerados en la parte inferior. Muchas veces es práctico añadir, debajo de cada individuo representado, algunos datos relevantes, como fecha de nacimiento, nombres y apellidos o resultados genotípicos de los análisis efectuados.

## Riesgo genético

Uno de los objetivos del asesoramiento es informar al consultante sobre el *riesgo genético*, es decir, la probabilidad que posee de padecer y/o transmitir a sus descendientes una enfermedad genética determinada, detectada en la genealogía de la que forma parte. Los riesgos de enfermar que presentan los individuos emparentados con los afectados varían según los tipos generales de enfermedades genéticas. De este modo, las de herencia monogénica entrañan un alto riesgo, mientras que éste es bajo o moderado en las debidas a herencia multifactorial.

El riesgo genético se expresa con cifras probabilísticas, cuya exactitud y precisión dependen tanto de la enfermedad de que se trate como de la tecnología empleada para la consecución de los diagnósticos genéticos.

En el contexto del asesoramiento genético debe tenerse muy en cuenta el concepto de *riesgo subjetivo*, es decir, la

percepción por parte del consultante de la cifra objetiva que resulta del cálculo matemático. Para una correcta comprensión del alcance del riesgo debe informarse al consultante sobre la gravedad de la enfermedad, su evolución y los costes familiares, sociales, psicológicos y económicos que representan el cuidado de los enfermos, así como de las eventuales soluciones terapéuticas, según los casos. Un riesgo de transmitir una enfermedad de un 7% puede considerarse soportable en una entidad grave y de curso rápido, como la enfermedad de Werdnig-Hoffmann, en la que los afectados fallecen en los primeros meses de vida extrauterina, y alto en casos de distrofia muscular de Duchenne o en formas juveniles más crónicas de atrofia muscular espinal, en las que los costes que representan los enfermos, dada su mayor esperanza de vida, son muy superiores. La repercusión psicológica que hayan producido los familiares afectados en los consultantes tendrá capital importancia en la toma de decisiones sobre la planificación familiar de estos últimos y en su actitud general frente a la enfermedad en cuestión.

Es muy importante aclarar, en el ámbito del asesoramiento genético, que el riesgo "no tiene memoria". La probabilidad de una pareja, con un hijo afectado de fibrosis quística, de tener otro hijo que padezca la enfermedad es siempre de 1/4, con independencia del fenotipo que tengan los anteriores hijos. Se trata, en términos matemáticos, de pruebas probabilísticas no exhaustivas.

## Equilibrio de Hardy-Weinberg

Consideremos un determinado gen autosómico dialélico  $A/a$ . Se pretende calcular, en una población de individuos diploides, las frecuencias ( $f$ ) alélicas:

$$f(a) = q; f(A) = p$$

y genotípicas:

$$f(AA) = P; f(Aa) = H; f(aa) = Q$$

y averiguar cómo se comportan a lo largo de las generaciones. Obsérvese que:

$$p + q = 1 \text{ y } P + H + Q = 1$$

Consideremos una población ideal en la que se cumplen un conjunto de condiciones: *a*) se trata de una población grande, teóricamente infinita; *b*) existe *panmixia* (el apareamiento entre los individuos se realiza completamente al azar) y *pangamia* (la fecundación es también al azar); *c*) no hay mutación (no aparecen nuevas formas alélicas, a partir de las preexistentes); *d*) no existe selección a favor o en contra de los alelos del gen, y *e*) no presenta migraciones (transferencias de individuos y/o genes entre las poblaciones).

En una población con las características citadas, las combinaciones al azar de los gametos, portadores de dotaciones haploides  $A$  o  $a$ , cuyas frecuencias en la población son respectivamente  $p$  y  $q$ , producirán individuos diploides cuyas frecuencias genotípicas vendrán dadas según el desarrollo  $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$ .

De este modo:

$$P = p^2; H = 2pq; Q = q^2 \quad [1]$$

¿Cuáles serán las frecuencias alélicas generadas ahora por una población con estas frecuencias genotípicas? En cualquier población, para un *locus* dialélico  $A/a$ :

$$p = P + H/2 \text{ y } q = Q + H/2 \quad [2]$$

Ello resulta evidente al considerar  $N$  individuos y su circunstancia de homocigotos ( $AA$  o  $aa$ ) o heterocigotos ( $Aa$ ), de forma que al tratarse de individuos diploides:

$$p = (2PN + HN)/2N \text{ y } q = (2QN + HN)/2N$$

Si sustituimos en [2] los valores  $P$ ,  $H$  y  $Q$  de [1], observaremos que las frecuencias alélicas  $p$  y  $q$  permanecen invariables. Si no intervienen otras causas externas a la población, ésta permanecerá constante en sus valores de frecuencias alélicas y, por consiguiente, genotípicas: estará en *equilibrio*.

El cálculo de las frecuencias genotípicas según el desarrollo del binomio al cuadrado y la invarianza, a lo largo de las generaciones, de las frecuencias alélicas, forman los supuestos de la *ley de Hardy-Weinberg*, enunciada en 1908 independientemente por ambos y por otros autores coetáneos. Como corolario de la ley, se menciona que una población que comience con unas frecuencias genotípicas cuyos valores no corresponden a los esperados según [1], si cumple los requisitos ideales citados anteriormente, en sólo una generación se establecerán las cifras de  $P$ ,  $H$  y  $Q$  en consonancia con el desarrollo del binomio [1].

En los genes de herencia ligada al sexo, la situación es mucho más compleja. En una población ideal como la anterior, las frecuencias alélicas y genotípicas fluctuarán, dependiendo de los valores iniciales en varones y mujeres, tendiéndose a un equilibrio final. Es posible deducir los valores de frecuencias correspondientes en los sistemas polialélicos, en los que se observa también una situación de equilibrio (en sólo una generación en los genes autosómicos y en el límite de generaciones en los ligados al sexo).

Ninguna de las circunstancias que hacen posible el equilibrio de Hardy-Weinberg se cumplen en la realidad, apartándose las poblaciones de las frecuencias esperadas según la citada ley. De todas formas, en muchas ocasiones las desviaciones son pequeñas y es útil asumir su cumplimiento. La fibrosis quística del páncreas o mucoviscidosis es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva, cuya incidencia se estima en un individuo afectado por cada 2.500 nacidos vivos. Para calcular la frecuencia del alelo deletéreo ( $q$ ) consideramos la distribución de los genotipos según la ley de Hardy-Weinberg, de forma que:

$$1/2.500 = Q = q^2 \text{ (frecuencia de homocigotos del alelo deletéreo } d/d\text{).}$$

De este modo:

$$q = \sqrt{Q} = 1/50 \text{ y } H = 2pq \approx 1/25 \text{ (con } p \approx 1\text{)}$$

es decir, una frecuencia de portadores (+/d) de aproximadamente uno en 25.

En una enfermedad autosómica dominante, los homocigotos para el alelo deletéreo ( $D/D$ ) son extraordinariamente raros ( $p^2 \approx 0$ ), y la baja incidencia ( $I$ ) de la enfermedad se corresponderá con los heterocigotos (+/D):

$$I = H = 2pq \approx 2p$$

siendo  $q \approx 1$ . De ese modo, la frecuencia del alelo deletéreo  $p = f(D)$  será:

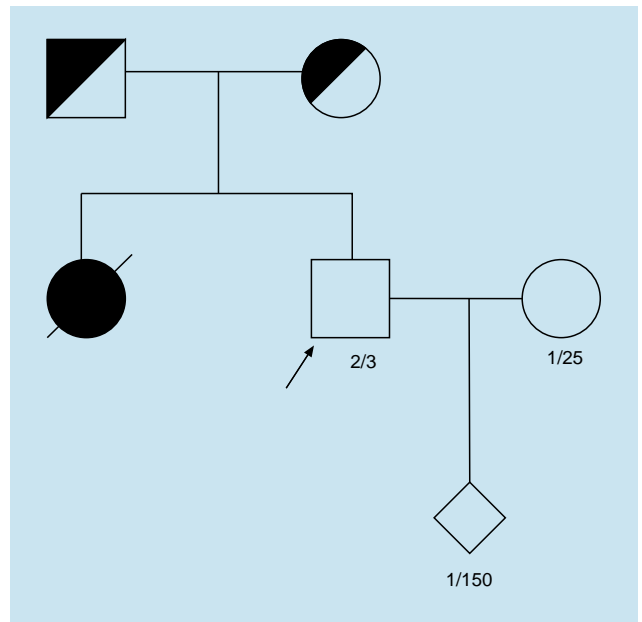
$$p = H/2$$

Así, si consideramos una incidencia de 5 afectados de ataxia cerebelosa autosómica dominante por cada 100.000 individuos, la frecuencia del alelo deletéreo para dicha entidad será:  $p = 0,000025$ . La frecuencia de homocigotos ( $D/D$ ) es despreciable.

### Riesgo de recurrencia

Se define como riesgo de recurrencia de una enfermedad genética la probabilidad de que ésta aparezca de nuevo en otro individuo de la genealogía donde ya ha sido advertida en uno (caso índice) o más casos.

La simple herencia mendeliana y la ley de Hardy-Weinberg permiten calcular la probabilidad de tener un hijo afectado de mucoviscidosis, un hermano del caso índice empa-



**Fig. 9.48.** Riesgo de recurrencia en una genealogía con un caso índice (I) diagnosticado de fibrosis quística.

rejado con una mujer de la población general. El hermano consultante es de fenotipo sano y, por consiguiente, tiene una probabilidad 2:1 de ser portador heterocigoto (+/d), frente a homocigoto (+/+) (herencia mendeliana simple). Un individuo sano de la población general tiene una probabilidad de ser heterocigoto:

$$\text{Probabilidad} = 2pq/[1 - q^2] = 2q/[1 + q] \approx 1/25 \text{ (para } q = 1/50\text{)}$$

$$\text{Probabilidad de hijo afectado} = 2/3 \times 1/25 \times 1/4 = 1/150 \text{ (fig. 9.48)}$$

En la mayoría de los casos el riesgo de recurrencia supone un cálculo de *probabilidad condicionada*, es decir, la probabilidad de que ocurra un suceso determinado (un nuevo afectado o portador), dado que se han producido una serie de sucesos (hechos, datos) en la genealogía (caso índice, otros afectados, individuos sanos, resultados del análisis molecular, etc.).

En un espacio muestral  $S$ , tal que  $p(S) = 1$  (donde  $p$  es la *probabilidad de*), se ha realizado una partición en subconjuntos (sucesos) disjuntos  $A_i$ , los cuales presentan intersección con otro subconjunto (suceso)  $B$  de  $S$ . La probabilidad de que ocurra el suceso  $A_i$  dado que ha sucedido el  $B$  se expresa como:

$$p(A_i \setminus B) = p(A_i \cap B) / p(B) = p(A_i) p(B \setminus A_i) / p(B)$$

Al anotar que:

$$p(B) = \sum p(A_i) p(B \setminus A_i),$$

resulta la expresión general del *teorema de Bayes*:

$$p(A_i \setminus B) = \frac{p(A_i) p(B \setminus A_i)}{\sum p(A_j) p(B \setminus A_j)}$$

$p(A_i)$  son las *probabilidades a priori*;  $p(B \setminus A_i)$  son las *probabilidades condicionadas*;  $p(A_i \setminus B)$  es la *probabilidad final*.

La distrofia muscular de Duchenne es un ejemplo de entidad con herencia recesiva ligada al sexo, en la que los varones afectados no dejan descendencia, dada la gravedad del cuadro clínico (el alelo deletéreo es letal). Una mujer de la

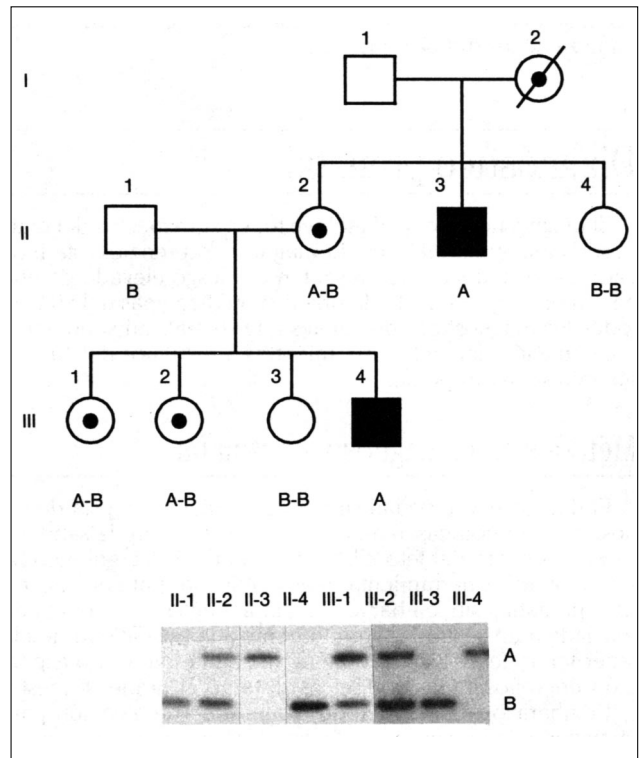
población general tiene una *probabilidad a priori* de ser portadora de distrofia muscular de Duchenne de 4 veces la tasa de mutación ( $4\mu$ ) (la tasa de mutación,  $\mu$ , se define como la proporción de alelos nuevos de un determinado tipo que aparecen, para un gen dado, en cada generación. En la distrofia muscular de Duchenne,  $\mu \approx 0,0001$ ). Es decir, la frecuencia de heterocigotos ( $+d$ ) es  $H = 4\mu$  (su demostración matemática se escapa a este texto). La probabilidad de que una pareja de la población general tenga un hijo varón afectado de distrofia muscular de Duchenne será:  $P = (1/2) 4\mu + \mu = 3\mu$  (sólo la mitad de los hijos varones de las mujeres portadoras heredarán el alelo deletéreo, añadiéndose también la probabilidad de que ocurra una nueva mutación [ $\mu$ ] en el óvulo de la madre). El hecho de haber tenido una mujer un hijo afectado de distrofia muscular de Duchenne modificará radicalmente las expectativas de recurrencia. El cálculo bayesiano indica que la probabilidad de una madre de ser portadora de un caso esporádico de distrofia muscular de Duchenne es de  $2/3$  (tabla 9.12). La probabilidad de que nazca un nuevo varón afectado será de  $1/3$ . Las altas tasas de mutación explican el mantenimiento en la población de los alelos deletéreos ( $d$ ), en este tipo de enfermedades, al compensar su pérdida en los individuos enfermos.

Es posible utilizar *loci próximos* al locus morbosus como *marcadores* y observar su segregación conjunta en una genealogía. Los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) son útiles como *loci* marcadores y permiten un cálculo de riesgo más preciso. Citamos un ejemplo de una genealogía con varios afectados de una enfermedad recesiva ligada al sexo (fig. 9.49), en la que las consultantes I-2 (fallecida) y II-2 son *portadoras obligadas*, al ser madres de afectados genealógicamente relacionados. Las consultantes II-4 y III-3 heredan el alelo B del marcador, que no se halla en los afectados por la enfermedad. Las consultantes III-1 y III-2 han heredado de su madre el alelo A, presente en su hermano y en su tío materno, ambos enfermos. Según el cálculo bayesiano y para una frecuencia de recombinación entre los *loci* marcador ( $A/B$ ) y de la enfermedad ( $+d$ ) de  $\theta$ , las mujeres que han heredado el alelo A tienen una probabilidad de haber heredado asimismo el alelo deletéreo ( $d$ ), *probabilidad*  $= 1 - 2\theta(1 - \theta)$ ; las que han heredado el alelo B, *probabilidad*  $= 2\theta(1 - \theta)$ . Es imprescindible que  $\theta$  sea muy pequeña (idealmente  $\theta = 0$ ), es decir, que los *loci* marcador y de la enfermedad estén muy próximos, para que el procedimiento diagnóstico sea útil.

En las enfermedades genéticas autosómicas dominantes el mantenimiento en la población de los alelos deletéreos ( $D$ ) se explica por mutación [a partir de los alelos salvajes (+)], y por su difusión a partir de los individuos no penetrantes y de los propios enfermos, al tratarse de procesos que merman pero no anulan la reproducción de estos últimos. Los procesos dominantes letales tienen una duración efímera en las poblaciones, al requerir su persistencia tasas de mutación demasiado altas. Para el cálculo del riesgo de recurrencia en una genealogía con un caso esporádico, se debe tener en cuenta la penetrancia ( $P$ ) (según las edades de los individuos) del genotipo ( $+D$ ) y las probabilidades de reproducción relativa [eficacia biológica ( $f$ )] de los enfermos, resultando expresiones bayesianas complejas. Con un único valor

**TABLA 9.12.** Probabilidad de una madre de ser portadora de un caso esporádico de una enfermedad genética recesiva letal ligada al sexo

Probabilidad	De ser portadora	De no ser portadora
<i>A priori</i>	$4\mu$	$1-4\mu \approx 1$
Condicionada de tener un afectado	$1/2$	$\mu$
Intersección	$2\mu$	$\mu$
Final	$\frac{2\mu}{2\mu + \mu} = 2/3$	$\frac{\mu}{2\mu + \mu} = 1/3$



**Fig. 9.49.** Genealogía de una enfermedad de herencia recesiva ligada al sexo. A y B representan los alelos de un fragmento de restricción de longitud polimórfica (RFLP) ligado al locus de la enfermedad. El alelo deletéreo ( $d$ ) segrega junto con el alelo A del locus marcador RFLP.

de penetrancia ( $P$ ), la probabilidad de que unos padres tengan otro hijo enfermo (sin hermanos sanos) es:

$$\text{Probabilidad} = P(1 - P)/2(1 - P)$$

Así, en la esclerosis tuberosa, considerando una penetrancia  $P = 0,9$  y una  $f = 0,25$ , resulta:

$$\text{Probabilidad} = 0,058$$

Las enfermedades autosómicas recesivas son las de mayor gravedad (las recesivas ligadas al sexo tienen una gravedad intermedia) con una tasa de mutación despreciable y una gran reserva de alelos ( $d$ ) en los heterocigotos asintomáticos. Alguna ventaja selectiva de estos últimos puede compensar la pérdida de alelos ( $d$ ) que ocurre en los enfermos, que no suelen dejar descendientes (otros fenómenos pueden explicar también la situación). El cálculo de riesgo de recurrencia debe tener en cuenta la consanguinidad (que aumenta las probabilidades de tener un nuevo hijo afectado) y el desequilibrio de ligamiento frente a determinados haplotipos de alelos marcadores (véase Análisis molecular indirecto, más adelante).

En los procesos multifactoriales el riesgo de recurrencia suele basarse en expresiones empíricas, fruto de la observación estadística. Deben tenerse en cuenta, asimismo, factores raciales y el área de procedencia de los individuos de la genealogía, valorando la consanguinidad (que facilita la homocigosis). Por ejemplo, el riesgo de recurrencia en los padres de un hijo previo con espina bífida se estima entre el 2 y el 5%.

El consejo genético va más allá de los valores de riesgo y del cálculo de las probabilidades para una enfermedad determinada. Los pacientes encuentran que la discusión general sobre las distintas consideraciones que forman parte de una enfermedad son de gran ayuda. Los pacientes y las pare-

jas deben conocer con certeza dónde se encuentran y la naturaleza de los distintos procesos.

## Diagnóstico prenatal

El diagnóstico prenatal incluye todos los aspectos del diagnóstico fetal y embrionario. El diagnóstico prenatal está indicado en las parejas que presentan un riesgo elevado de una enfermedad genética. En la práctica médica, más del 90% de todos los diagnósticos prenatales que se realizan suponen la continuación del embarazo, mientras que menos del 10% requieren su interrupción.

### Métodos en el diagnóstico prenatal

El diagnóstico prenatal se realiza mediante biopsia de vellosidades coriónicas, amniocentesis, extracción de sangre o examen directo del feto. El análisis del líquido amniótico ha sido una de las herramientas más empleadas para el diagnóstico prenatal; sin embargo, la amniocentesis ha quedado relegada a un segundo término frente a la posibilidad de obtener tejido fetal. Éste se obtiene mediante biopsia o aspiración de vellosidades coriónicas durante el primer trimestre del embarazo, y es el método diagnóstico de elección para la mayoría de los casos.

Una vez obtenido el material fetal (líquido amniótico o vellosidades coriónicas), los estudios citogenéticos permiten detectar las anomalías cromosómicas, el cultivo de las células fetales ayuda al diagnóstico de muchas alteraciones metabólicas, la determinación de las concentraciones de alfafetoproteína o acetilcolinesterasa en líquido amniótico confirma defectos del tubo neural y el análisis del DNA permite el diagnóstico molecular de la mayoría de las enfermedades hereditarias.

La posibilidad de obtener sangre fetal mediante punción del cordón umbilical (cordocentesis) facilitó inicialmente el diagnóstico de varios procesos hereditarios, como las hemoglobinopatías, los defectos enzimáticos eritrocitarios, las hemofilias o la enfermedad de Von Willebrand. Los principales problemas con esta técnica radican en la escasa muestra que se obtiene, la mortalidad fetal próxima al 3% y la mortalidad materna debido a la posibilidad de hemorragias o infecciones. Como en el caso de la amniocentesis, la obtención de sangre fetal no puede realizarse hasta el segundo trimestre del embarazo, con lo que para la mayoría de los procesos no es posible obtener el diagnóstico hasta la 20.<sup>a</sup> semana. Finalmente, existe la posibilidad de contaminación de la muestra con sangre materna.

La exploración directa del feto puede realizarse mediante ecografía, que permite la detección de muchas malformaciones congénitas.

### Amniocentesis

La amniocentesis consiste en la extracción de líquido amniótico. Se realiza generalmente entre las semanas 14.<sup>a</sup> y 20.<sup>a</sup> del embarazo, cuando hay alrededor de 200 mL de líquido en la cavidad amniótica. Para su extracción se introduce una aguja en la cavidad uterina, a través de la pared abdominal, bajo control ecográfico. Se extraen entre 10 y 20 mL de líquido, que son suficientes para la mayoría de los estudios. Sin embargo, para el análisis de DNA, con la nueva tecnología de amplificación de DNA (PCR) pueden ser suficientes incluso cantidades inferiores a 1 mL.

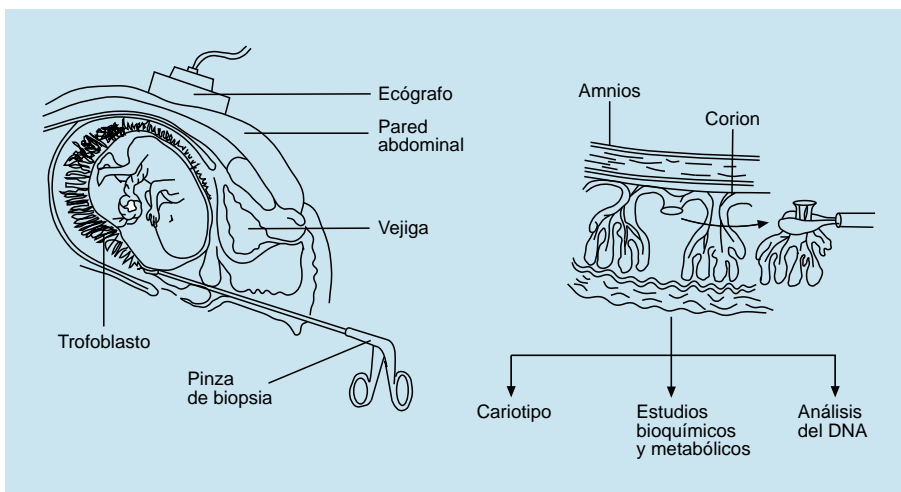
Con el líquido extraído pueden realizarse varios tipos de pruebas, entre las que deben destacarse: cariotipo, análisis metabólicos y bioquímicos, y análisis del DNA. Las nuevas tecnologías en genética molecular y la práctica más extendida de la biopsia de corion están relegando la amniocentesis sólo a los análisis de metabolopatías y defectos bioquímicos o cuando la paciente acude a consultar en avanzado estado de gestación.

### Vellosidades coriónicas

Uno de los principales avances en el diagnóstico prenatal ha sido la posibilidad de obtener vellosidades coriónicas a partir del primer trimestre del embarazo. Tras la implantación del embrión el *trofoblasto* tapiza la cavidad uterina. Hacia las 8 semanas el trofoblasto es de mayor tamaño que el feto. Las células del trofoblasto son diploides y de *origen fetal*. A partir de la 8.<sup>a</sup> semana de gestación es posible biopsiar o aspirar una muestra de las vellosidades coriónicas frondosas, bajo control ecográfico (fig. 9.50).

A partir de las vellosidades coriónicas es posible obtener suficiente cantidad de DNA para varios análisis. Por otra parte, la cantidad de material celular obtenido permite el análisis citogenético directo sin requerir cultivos celulares. Debido a las peculiaridades del tejido fetal, es fácil separar el tejido coriónico del material contaminante materno, en especial para estudios de DNA o para el análisis cromosómico. Sin embargo, cuando las células coriónicas se cultivan para estudios citogenéticos o bioquímicos, las células maternas pueden proliferar mejor que las fetales y ocasionar problemas diagnósticos. Los abortos producidos tras biopsia coriónica son, en manos expertas, sensiblemente inferiores al 2%, cifra similar a la de la amniocentesis.

La biopsia coriónica tiene frente a la amniocentesis la gran ventaja de permitir el diagnóstico durante el primer



**Fig. 9.50.** Biopsia de vellosidades coriónicas. Durante el primer trimestre del embarazo es posible obtener material fetal que puede ser objeto de varios estudios.



trimestre del embarazo, con las indudables ventajas que implica el diagnóstico precoz para la madre y la pareja, en particular si debe procederse a la interrupción del embarazo.

## Cariotipo fetal

Las principales indicaciones del estudio del cariotipo fetal son: la edad avanzada de la madre, los antecedentes de *aneuploidía* en uno de los hijos de la pareja y los embarazos en que uno de los padres tiene una alteración cromosómica. Hasta hace poco se realizaba para determinar el sexo del feto, pero en la actualidad es mucho más simple y rápida la determinación de la presencia del cromosoma Y mediante análisis del DNA utilizando PCR.

Más de dos tercios de las alteraciones cromosómicas se asocian a abortos espontáneos. Del tercio restante que llega a nacer, casi la mitad se debe a la presencia de un cromosoma extra. Para la mayoría de los casos no existe historia familiar de la alteración, y el riesgo de recurrencia es relativamente bajo (1%). Ciertas anomalías cromosómicas pueden detectarse a través de varias generaciones debido a la tendencia a producir abortos espontáneos y defectos del nacimiento.

Alrededor del 0,5% de los nacimientos vivos tienen anomalías cromosómicas, la mayoría de las cuales son responsables de graves alteraciones (tabla 9.13). El cariotipo fetal debe realizarse cuando la madre tiene más de 35 años, edad a partir de la cual el riesgo de *aneuploidía* (presencia de un cromosoma extra) es mayor. Este riesgo aumenta de forma exponencial con la edad materna avanzada para las trisomías 21, 18 y 13, y para el 47,XXX y 47,XXY. La relación entre edad materna e incidencia de trisomía 21 se representa en la tabla 9.14. Los avances que se están realizando en citogenética molecular sugieren que la estrategia en la prevención de la *aneuploidía* se basará en la hibridación *in situ*, al menos en el grupo poblacional con un riesgo menor.

## Alteraciones cromosómicas en el diagnóstico prenatal

A menudo se encuentran alteraciones en el número de cromosomas sexuales en el curso de un estudio prenatal para el síndrome de Down. Éstas incluyen el síndrome de Turner (45,X), la hembra triple X (47,XXX), el síndrome de Kline-

TABLA 9.14. Relación entre edad materna y trisomía 21

Edad materna	Trisomía 21 (%)
35	0,35
36	0,57
37	0,68
38	0,81
39	1,09
40	1,23
41	1,47
42	2,19
43	3,24
44	2,96
45	4,53
46	8,19

Datos obtenidos de FERGUSON SMITH MA y YATES JRW. Prenatal Diagnosis 1984; 4: 5-45.

felter (47,XXY) y el varón 47,XXY (véase Anomalías cromosómicas, anteriormente citado). El hallazgo de tales alteraciones plantea a la pareja la posibilidad de la interrupción del embarazo, decisión que debe ser tomada sólo por la propia pareja, tras la pertinente exposición de la situación por parte del médico.

En otras ocasiones se detectan reordenamientos cromosómicos, la mayoría de los cuales son hereditarios. Es difícil la valoración de estos casos, ya que no se dispone de un cariotipo de los padres y no se conoce con certeza las consecuencias clínicas de tales anomalías. El riesgo de que un padre con una translocación cromosómica *balanceada* tenga un hijo con una translocación *no balanceada* depende del tipo de anomalía, del cromosoma afectado, del lugar de rotura cromosómica, del sexo y de la edad del portador de la anomalía cromosómica.

Las translocaciones *de novo* balanceadas plantean un importante problema de interpretación, y el riesgo de que se acompañen de alteraciones fenotípicas varía entre el 1 y el 14%, mientras que el riesgo de anomalías en el nacimiento en general –sin estudios cariotípicos previos– es del 1-2%. Por este motivo deben ser los padres quienes decidan sobre el embarazo, sin que esté justificado recomendar su interrupción. Por otra parte, el riesgo de anomalías fenotípicas en el caso de encontrar cromosomas supernumerarios varía entre el 5 y el 30%.

## Análisis metabólicos y bioquímicos

El diagnóstico prenatal de alteraciones del metabolismo puede realizarse para más de 70 procesos. El líquido amniótico puede cultivarse con el objeto de obtener suficientes células para analizarlas para la enzima de interés. El estudio de las concentraciones de alfa-fetoproteína en líquido amniótico está indicado en los casos en los que existe riesgo de defectos del tubo neural, y están elevados en el caso de anencefalias o espinas bífidas abiertas. Sin embargo, en la actualidad la anencefalia puede diagnosticarse perfectamente mediante ecografía, y el diagnóstico de la espina bífida ha mejorado considerablemente con la determinación de la acetilcolinesterasa en el líquido amniótico.

El principal problema del diagnóstico bioquímico es la dificultad o imposibilidad de dosificar la proteína específica. En la mayoría de los casos la proteína de interés es de difícil acceso, como sucede con la hemoglobina eritrocitaria para el diagnóstico de las hemoglobinopatías o la fenilalanina-hidroxilasa hepática en la detección de la fenilcetonuria. En otras situaciones, la posibilidad de contaminación materna es crítica para el diagnóstico, como es el caso de la mayoría de las coagulopatías. A pesar del indudable valor del diagnóstico bioquímico, la tecnología del DNA recombinante tiene enormes ventajas frente a la bioquímica al permitir el análisis en el primer trimestre del embarazo y al ampliar las posibilidades diagnósticas a las enfermedades cuyo producto proteico es desconocido.

TABLA 9.13. Detección de anomalías cromosómicas en embarazos de mujeres mayores de 35 años de edad, comparada con datos del total de nacimientos

Tipo de alteración cromosómica	Diagnóstico prenatal (%)	Seguimientos en el total de nacimientos	
		(%)	Índice
Alteraciones autosómicas			
Trisomía 21	1,16	0,12	1/700
Trisomía 18	0,23	0,01	1/3.000
Trisomía 13	0,07	0,01	1/5.000
t(13q14q)	0,05	0,07	
Otras translocaciones balanceadas	0,18	0,12	
Marcador cromosómico extra	0,06	0,02	
Otras translocaciones no balanceadas	0,08	0,06	
Alteraciones en los cromosomas sexuales			
47,XXX	0,25	0,10	1/800
47,XXY	0,33	0,09	1/700
47,YY	0,07	0,09	1/800
45,X	0,09	0,01	1/2.500
Otras alteraciones	0,05	0,06	

Datos obtenidos de FERGUSON SMITH MA y YATES JRW. Prenatal Diagnosis 1984; 4: 5-45, y de HOOK EB, HAMERTON JL. En: HOOK EB, PORTER IH, eds. Population Cytogenetics: Studies in Humans. Nueva York, Academic Press, 1977; 63.

## DNA fetal

El análisis del DNA fetal mediante las técnicas de genética molecular permite realizar un diagnóstico prenatal preciso de muchas enfermedades genéticas. El DNA se obtiene preferentemente del material procedente de una *biopsia de corion* (vellosidades coriónicas). Actualmente se realiza una biopsia incisional bajo control ecográfico, vía transabdominal (la más habitual) o transcervical (de elección en la disposición anatómica del útero en retroversión), a partir de las 9-10 semanas de gestación. De una biopsia coriónica se obtienen entre 20 y 50 µg de DNA.

También puede obtenerse DNA a partir de amniocitos (amniocentesis). Para la extracción de suficiente cantidad de DNA los amniocitos deben cultivarse 1 o 2 semanas, aunque actualmente la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar DNA a partir de muy pocas células (1 mL de líquido amniótico puede ser suficiente). Las posibilidades de contaminación de las muestras con celularidad materna son grandes, pudiendo la propia PCR falsear los resultados al amplificar pequeñas cantidades de DNA contaminante. La amniocentesis se realiza a partir de las 16 semanas de gestación (si se indica la interrupción del embarazo, la fecha límite legal es actualmente de 22 semanas). Todo lo expuesto no aconseja el uso de los amniocitos como método de elección para estudiar el DNA fetal.

Asimismo, es posible la obtención de DNA a partir de sangre fetal, tras cordocentesis. La posibilidad de contaminación a partir de sangre materna es otro de los principales inconvenientes.

## Diagnóstico molecular

Con el advenimiento de la tecnología de SOUTHERN (1975), el descubrimiento de los FRLP (BOTSEIN, 1980) y la PCR (MULLIS, 1987), junto a los modernos procedimientos de electroforesis y secuenciación (véase Principios del análisis genético, anteriormente citado), actualmente es posible efectuar un *diagnóstico directo*, detectando muchas mutaciones causantes de anomalías hereditarias. Cuando ello no es factible, se realiza un *diagnóstico indirecto*, estudiando la segregación de *loci* marcadores, principalmente mediante el estudio de FRLP o VNTR/STRP (secuencias polimórficas de repetición en tándem).

### Análisis molecular directo

Actualmente son muchos los genes identificados y aislados (clonados), responsables de enfermedades hereditarias. Las posibilidades de análisis dependen del defecto molecular en cuestión (véase Mapa del genoma humano y Principios de análisis genético, anteriormente citado).

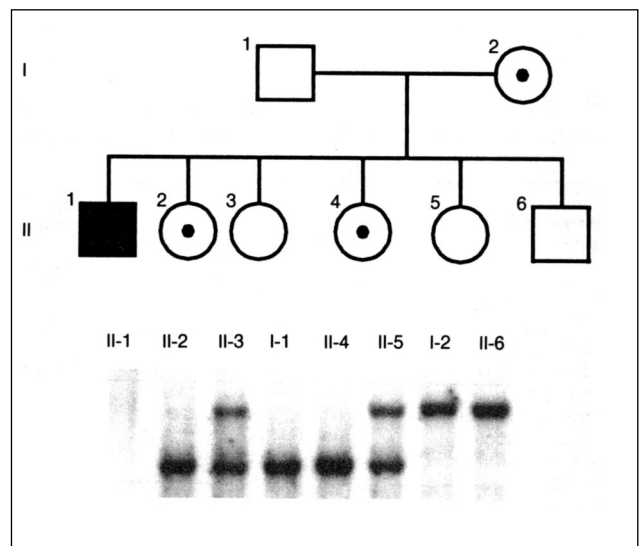
### Microdeleciones y microduplicaciones

Las microdeleciones son pérdidas de DNA de una megabase (Mb) o inferiores. En la distrofia muscular de Duchenne/Becker (DMD/B) más del 50% de las mutaciones corresponden a microdeleciones. La PCR permite su rápida detección utilizando *primers* o cebadores que amplifican 18 regiones del gen, especialmente alteradas en la DMD/B. En la actualidad se utilizan dos reacciones de 9 parejas de *primers* cada una (sistema *multiplex*). Tras la PCR se practica una electroforesis, visualizándose el DNA (bandas) con bromuro de etidio en un transiluminador de luz ultravioleta. De esa forma deben aparecer las 18 *bandas* de DNA correspondientes a las distintas regiones. La ausencia de producto amplificado (ausencia de las bandas) identifica las deleciones. Mediante ese procedimiento sólo es posible observar deleciones en los individuos varones (un solo cromosoma X), al obtener siempre amplificación del alelo sano (+) en las mujeres heterocigotas (+/-). Usada de esta forma, la PCR permite el diagnóstico prenatal, pero no el de mujeres portadoras.

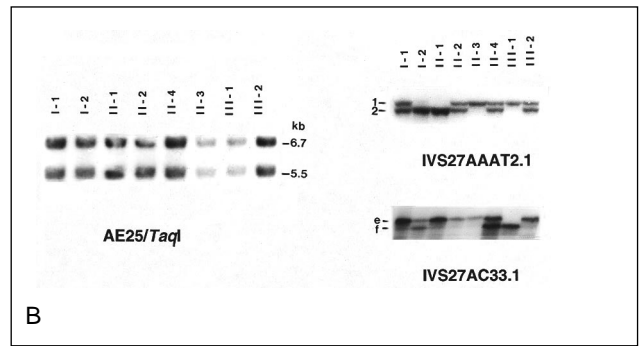
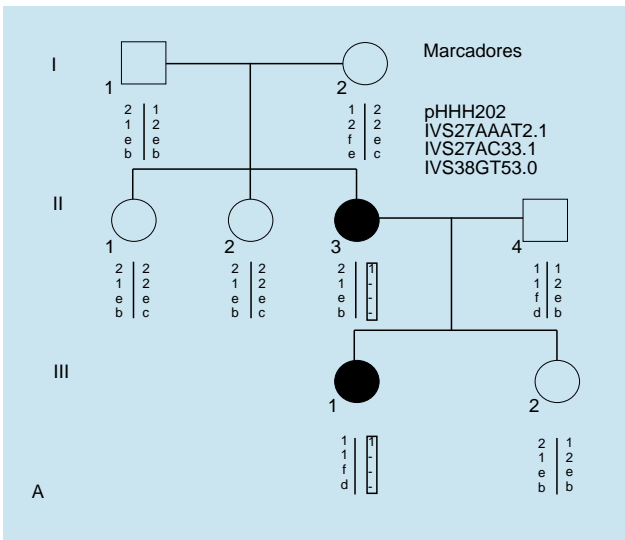
Utilizando segmentos del cDNA (complementario al mRNA) del gen DMD/B como sondas, es posible visualizar un patrón característico de bandas (fragmentos de restricción), en un DNA digerido con la enzima de restricción *HindIII*. La ausencia de determinadas bandas en el DNA de un varón afectado por la enfermedad define y sitúa las deleciones del gen DMD/B en ese individuo índice. Ello permite la detección directa de esa deleción en el DNA procedente de una biopsia de corion y el diagnóstico de mujeres portadoras (+/-) al observar la *intensidad de banda* (efecto dosis) de los fragmentos correspondientemente ausentes en el DNA del familiar enfermo (caso índice): una portadora poseerá 1/2 de la intensidad (densidad óptica) de banda (una única dosis, +/-) que las no portadoras (dos dosis, +/+). El mismo criterio de la intensidad de banda (dosis) indicará la presencia de deleciones en otras enfermedades, pero la subjetividad en la interpretación de los resultados hace que el método no esté exento de errores, especialmente en los procesos autosómicos dominantes (enfermedad de Von Recklinghausen, retinoblastoma), en los que la deleción en el caso índice está enmascarada por la banda correspondiente al alelo sano (+/-).

Muchas veces es posible detectar una deleción que interesa un *locus* marcador, pudiéndose observar la *pérdida de alelos*, lo cual permite establecer diagnósticos objetivos. En el núcleo familiar de la **figura 9.51**, la sonda intragénica P20 detecta la ausencia de los FRLP correspondientes en el caso índice (II-1), afectado de distrofia muscular de Duchenne. Sus hermanas (II-2 y II-4) sólo han heredado el fragmento (alelo) procedente de su padre (I-1). De este modo, la consultante (I-2), aparentemente homocigota, resulta ser *hemicigota*, es decir, portadora de la deleción (+/-). Obsérvese que la banda correspondiente a los fragmentos de restricción de la consultante es aproximadamente de la misma intensidad que la de su hijo sano (II-6) (una sola dosis).

En la genealogía de la **figura 9.52** se diagnostica neurofibromatosis tipo I (NF1) en el individuo III-1 (caso índice). Su madre (II-3) está asimismo afectada. El análisis genético (véanse los apartados correspondientes) se efectúa con distintos *loci* marcadores:

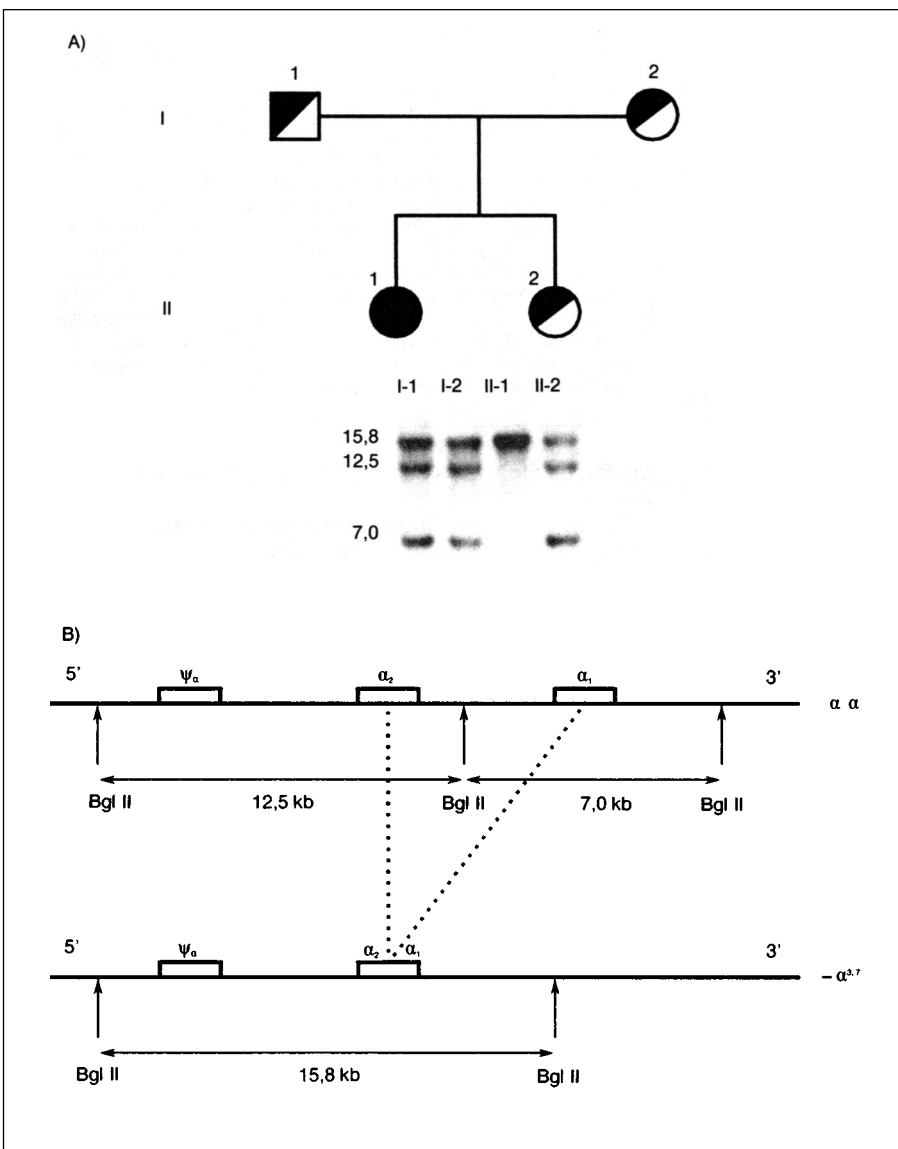


**Fig. 9.51.** Núcleo familiar con un caso esporádico de distrofia muscular de Duchenne. El DNA de los distintos individuos se digiere con *EcoRV* y se hibrida con la sonda P20, que detecta un fragmento de restricción de longitud polimórfica (FRLP) intragénico en el intrón 44 del gen. Los fragmentos son de 7,0 y 7,5 kb. No se observan los mencionados fragmentos en el caso índice II-1, lo que se interpreta como una extensión intrónica de una deleción. II-2 y II-4 sólo heredan el fragmento (alelo) de 7 kb, procedente de I-1, lo que revela, junto con I-2, su condición de hemicigotas (+/-). II-3, II-5 y II-6 heredan de su madre I-2 el alelo sano (+), de 7,5 kb (véase el texto).



individuos con las fases alélicas (haplotipos) más probables de los loci pHHH202, IVS27AAAT2.1, IVS27AC33.1 y IVS38GT53.0. II-3 únicamente hereda los alelos procedentes de su padre I-1, en los loci IVS27AAAT2.1 y IVS38GT53.0. III-1 sólo hereda los alelos paternos para los loci IVS27AC33.1 y IVS38GT53.0. B. Autorradiografías AE25/TaqI: las bandas de los individuos II-3 y III-1 son de la mitad de intensidad que las demás. IVS27AAAT2.1: II-3 sólo hereda el alelo 1, procedente de su padre, I-1. Los alelos 1 y 2 se diferencian en 4 nucleótidos (AAAT). IVS27AC33.1: III-1 sólo hereda el alelo f procedente de su padre, II-4. Los alelos e y f se diferencian en 2 nucleótidos.

**Fig. 9.52.** Análisis genético de una genealogía con neurofibromatosis tipo 1 (enfermedad de Von Recklinghausen). A. Genotipos de los



**Fig. 9.53.** Detección de una delección en el complejo de los genes de la α-globina. A. Patrón de segregación de alfafalasia en una familia con un miembro (II-1) homocigoto para una delección de 3,7 kb. B. Al digerir el DNA de los distintos individuos con Bgl II, se generan dos fragmentos de 12,5 y 7,0 kb (presencia de diana, alelo normal). La delección destruye la diana, obteniéndose un fragmento de 15,8 kb.

1. *Locus* extragenético tipo FRLP con diana de restricción polimórfica frente a la enzima *RsaI*, puesta de manifiesto al digerir el producto amplificado (PCR) de una región próxima al gen NF1 [situada a 5' de éste, con una distancia genética menor a 1 centimorgan (cM)] denominada pHHH202.

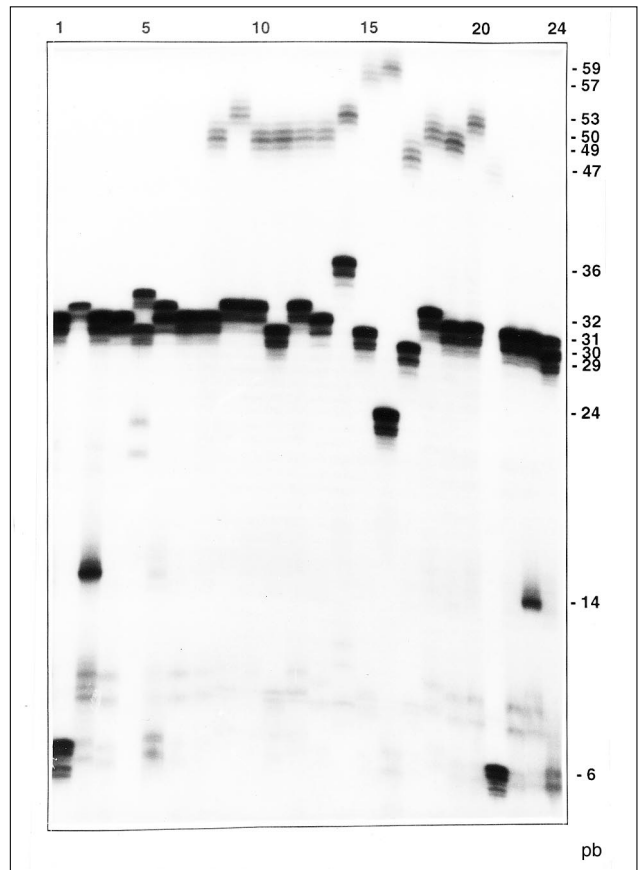
2. *Loci* intragénicos: a) RFLP obtenidos con digestión *TaqI*, con la sonda AE25 (AE25/*TaqI*); b) *loci* tipo STRP o microsatélites IVS27AC33.1 y IVS38GT, que corresponden a distintas unidades de repetición dinucleotídicas (AC)<sub>n</sub> y (GT)<sub>n</sub>, respectivamente, situados en intrones del gen; c) *locus* IVS27AAAT2.1, que corresponde a una secuencia intrónica polimórfica tipo *Alu*. Obsérvese que II-3 sólo ha heredado los alelos procedentes de su padre I-1, en los *loci* IVS27AAAT2.1 y IVS38GT53.0. El caso índice III-1 sólo hereda los alelos paternos (II-4), para los *loci* IVS27AC33.1 y IVS38GT53.0. Ello indica la presencia de una delección del gen NF1 que incluye a los tres *loci* marcadores intragénicos. Las distintas fases alélicas (haplotipos) están construidas de modo que no impliquen recombinaciones. Véase que la mutación se originó en la célula germinal de la abuela del caso índice I-2, al ser ésta heterocigota para marcadores delecionados en sus descendientes afectados. Obsérvese que, según el análisis de sus haplotipos, II-1, II-2 y III-2 no son portadoras de la delección. Utilizando el FRLP detectado por la sonda AE25 con la enzima *TaqI* se obtienen dos tipos de fragmentos, 6.7 y 5.5 kb, y en los individuos II-3 y III-1 (enfermos con la delección, +/-), los fragmentos presentan aproximadamente la mitad de intensidad que en los demás, debido a la *dosis única* procedente del cromosoma *sano* (sin la delección).

En otras circunstancias, como en la alfatalsemia, en la distrofia muscular de Duchenne o la hemofilia A pueden generar fragmentos de distinto tamaño, equivalentes a la pérdida de DNA en la delección (fig. 9.53). Aparte ciertas enfermedades como la distrofia muscular de Duchenne, en las que las delecciones son la norma, las grandes anomalías en los genes representan sólo una pequeña parte de los defectos que podemos encontrar. Por ejemplo, sólo el 1% de los alelos betatalasémicos son debidos a delecciones o reordenamientos del gen de la β-globina, y este tipo de alteraciones sólo representan el 5% de los casos de hemofilia A.

Las microduplicaciones son réplicas de un segmento determinado, en situación dispersa o contigua (en tándem). Son causa de anomalías en varios procesos como la DMD/B, las alfatalsemias y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (cromosoma 17). Algunas de estas duplicaciones son de gran tamaño, como es el caso de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, y pueden detectarse mediante el empleo de hibridación *in situ* con marcadores fluorescentes (FISH) o electroforesis en geles en campos pulsantes (PFGE). Tanto la FISH como la PFGE constituyen métodos moleculares de análisis directo de alteraciones genéticas, que cubren el espacio existente entre la tecnología molecular clásica y la citogenética convencional. La FISH permite la detección fácil de lesiones cromosómicas y moleculares, en las que la trisomía 21 y una delección de pocas kilobases en el gen NF1 constituyen dos ejemplos situados a ambos extremos de su amplio espectro de análisis.

**Expansiones de trinucleótidos**

Recientemente se ha descrito un mecanismo mutacional no conocido en otras especies animales. Se trata de mutaciones en las que una secuencia repetitiva presenta un número anormalmente incrementado de copias. Estas secuencias son trinucleótidos ricos en guanina y citosina. La ataxia cerebelosa autosómica dominante, uno de cuyos genes se encuentra en el cromosoma 6 (fig. 9.54), la enfermedad de Huntington (cromosoma 4) y la atrofia muscular espinobulbar (cromosoma X) dependen de incrementos en la secuencia (CAG)<sub>n</sub> en la región 5' de los respectivos genes. La secuencia (CAG)<sub>n</sub> codifica para un segmento polipeptídico de poliglutamina. En el retraso mental ligado al cromosoma X frágil el trinucleótido es (CGG)<sub>n</sub> en la región 5' transcrita, pero no traducida, del gen. En la distrofia miotónica (enfer-



**Fig. 9.54.** Autoradiografía de los productos (alelos) de una PCR en una amplia genealogía con enfermos afectados de ataxia cerebelosa autosómica dominante. Uno de los dos primers está marcado con <sup>32</sup>P en su extremo 5' (posición γ). Electroforesis en poliacrilamida desnaturalizante al 6% [desplazamiento de arriba (cátodo) abajo (ánodo)]. La técnica permite observar una única cadena de DNA por alelo, con distintas unidades de repetición (CAG)<sub>n</sub>. A la derecha se explicitan los tamaños (pb) de los fragmentos expresados en repeticiones. Las columnas desde la 8 a la 21 corresponden a individuos que presentan un alelo mutado de tamaño superior a n = 47.

medad de Steinert) se trata de (CNG)<sub>n</sub> (N = pirimidina) en la región 3'.

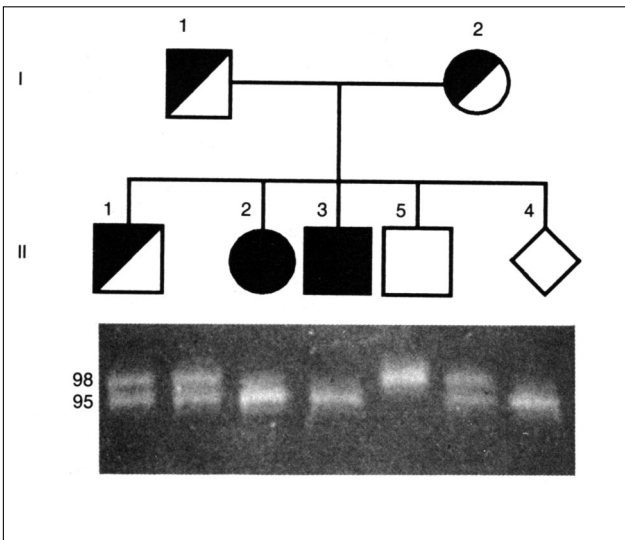
La expansión de trinucleótidos puede detectarse fácilmente mediante PCR. Los individuos normales presentan distintos tamaños para estas zonas repetitivas, mientras que los pacientes con dichos trastornos tienen un número de repeticiones superiores a los valores normales. En estos individuos existe inestabilidad en el número de repeticiones, por lo que éstas aumentan de una generación a otra. Los incrementos que se producen están también asociados a una mayor gravedad del proceso o a un inicio más precoz de la sintomatología.

**Mutaciones puntuales**

Las mutaciones puntuales corresponden a las alteraciones que incumben a uno o pocos nucleótidos. El tipo más frecuente de mutación puntual es la *transición*, con sustitución de una purina por otra purina o de una pirimidina por otra pirimidina. La *transversión* corresponde al reemplazo de una purina por una pirimidina, o viceversa.

En los genes estructurales (que codifican para proteínas), las mutaciones puntuales pueden producir el reemplazo de un aminoácido por otro en el producto proteico. Estas mutaciones se denominan de *cambio de sentido (missense)* y el efecto funcional que ocasionan dependerá de la ubicación y del tipo de aminoácido afectado. Una mutación denominada *sin sentido (nonsense)* es la que origina un codón de *stop* (UAG, UAA o UGA), que termina prematuramente la traduc-





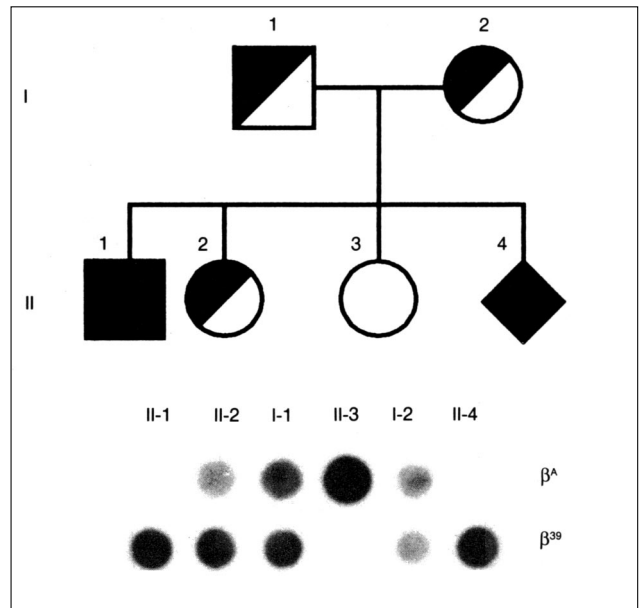
**Fig. 9.55.** Diagnóstico prenatal de mucoviscidosis. Electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6% de los productos de PCR. Se amplifica una región del exón X del gen regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) de modo que el alelo normal consiste en un fragmento de 98 pb y el alelo mutado de 95 pb, debido a la delección de 3 pb,  $\Delta F508$ . Los enfermos, II-2 y II-3, presentan la delección  $\Delta F508$  en ambos cromosomas. El feto ha heredado asimismo el genotipo homocigoto para la delección.

ción, truncándose el polipéptido resultante. Una mutación *silenciosa* es la que no opera cambio alguno en el aminoácido codificado (a pesar del cambio del codón); se debe a la degeneración del código genético (véase el apartado correspondiente). Una mutación *neutra* es la que opera un cambio de aminoácido que no tiene ninguna repercusión funcional en la proteína final.

Una mutación que altera el *splicing* es aquella que interviene en el procesamiento del mRNA o RNA maduro, en la supresión de las secuencias intrónicas. Las mutaciones de *splicing* pueden producirse en distintas partes de un gen, siendo las más características las que se sitúan en las regiones *dadoras* o *aceptadoras* de intrones. El mecanismo mutacional más frecuente en estas mutaciones es el cambio de una base por otra (transiciones o transversiones), aunque pequeñas delecciones o inserciones pueden tener el mismo efecto.

Existen mutaciones que implican la adición o la delección de uno o de varios nucleótidos, de forma que la pauta de lectura del código genético del gen en cuestión queda alterada. Estas mutaciones se denominan de *corrimiento de molde* (*frameshift*). Originan una proteína anómala, con varios cambios en la secuencia de aminoácidos, o (más orientemente) una proteína truncada, debido a la creación de un codón de *stop* más adelante. En algunas circunstancias las delecciones de nucleótidos en grupos de tres o más producen una proteína en la que faltan uno o varios aminoácidos. Estas proteínas son generalmente no funcionales. La mutación más frecuente en la fibrosis quística consiste en la delección de sólo tres pares de bases ( $\Delta F508$ ) en el exón 10 del gen CFTR. Esta delección representa alrededor del 50% del conjunto de las mutaciones del mencionado gen en la población española. La identificación de la mutación  $\Delta F508$  se realiza mediante PCR y electroforesis en geles de poliacrilamida (fig. 9.55).

Es posible determinar el genotipo de los distintos individuos de una genealogía utilizando oligonucleótidos sintéticos con secuencias definidas de manera que hibriden (véase Principios del análisis genético, anteriormente citado) con la secuencia del alelo normal o con la del mutado, para determinar gen responsable del proceso patológico (fig. 9.56). Si la mutación provoca una alteración en una diana de restricción, la enzima es de utilidad diagnóstica (fig. 9.57).



**Fig. 9.56.** Diagnóstico prenatal en una familia con un hijo, II-1, afectado de betatalasemia. La mutación puntual corresponde a una transición C  $\rightarrow$  T en el codón 39 del gen  $\beta$ , originándose un codón de stop (mutación sin sentido). El empleo de oligonucleótidos específicos para esta mutación ( $\beta^{39}$ ) y para la secuencia normal del gen de la  $\beta$ -globina ( $\beta^A$ ), permiten realizar el diagnóstico de feto homocigoto ( $\beta^{39}/\beta^{39}$ ) en II-4.

### Análisis molecular indirecto

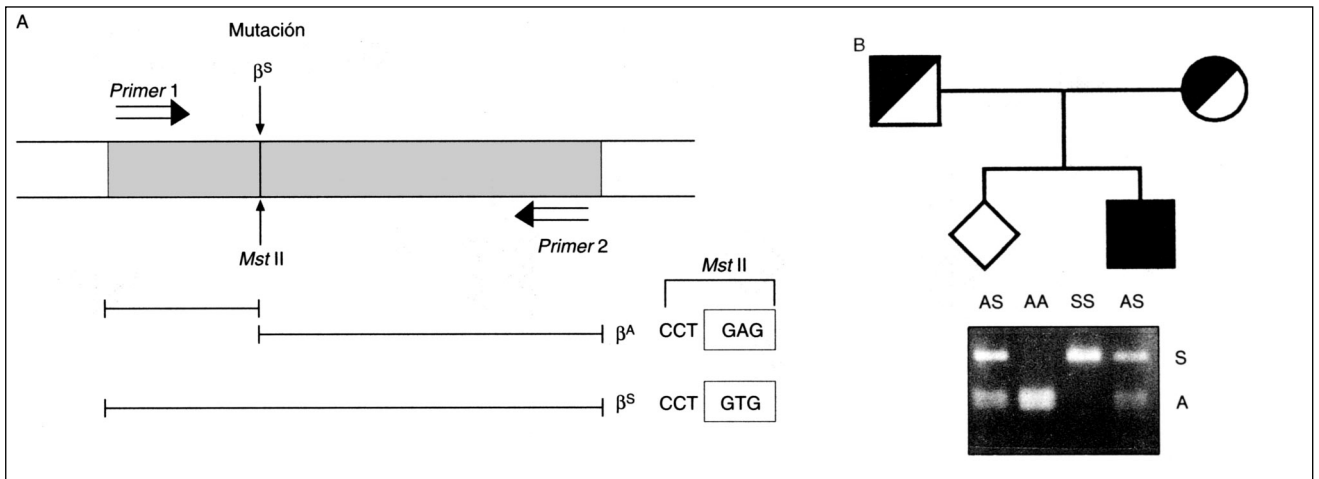
Cuando no se detecta la mutación causante de una enfermedad genética, se debe realizar un diagnóstico de tipo indirecto. Dicho procedimiento es ineludible cuando no se ha aislado el gen del proceso morboso. Si se conoce el gen de la enfermedad, puede ser también necesario el diagnóstico indirecto cuando no se conocen las mutaciones o si su determinación es técnicamente demasiado compleja o muy costosa. En el diagnóstico indirecto, al no examinar el defecto molecular responsable, es indispensable que el diagnóstico clínico en el caso índice sea correcto, y es fundamental la fenotipificación en el resto de la genealogía (véase Historia familiar, anteriormente citado).

El diagnóstico indirecto se basa en la utilización de *loci* marcadores (véase Principios del análisis genético, anteriormente citado), próximos al del proceso morboso, para observar la segregación conjunta de sus respectivos alelos. Para establecer la probabilidad de poseer un genotipo determinado se utiliza el *cálculo bayesiano*. Deben existir estudios previos de *análisis de ligamiento genético* para disponer de buenas estimaciones de la frecuencia de recombinación entre cada marcador y el *locus* de la enfermedad y la posición relativa (ordenación) de todos ellos. De ese modo se construirán mapas donde se especifiquen todos estos datos. Para minimizar el error debido a la frecuencia de recombinación, se usarán *loci* marcadores *flanqueantes* al gen de la enfermedad; de este modo serían necesarios dos entrecruzamientos meióticos (uno a cada lado del gen) para obtener un recombinante, suceso mucho menos probable. Este último se calcula como el producto de dos sucesos independientes (obviándose la interferencia),  $\theta$  (final) =  $\theta_1 \times \theta_2$ .

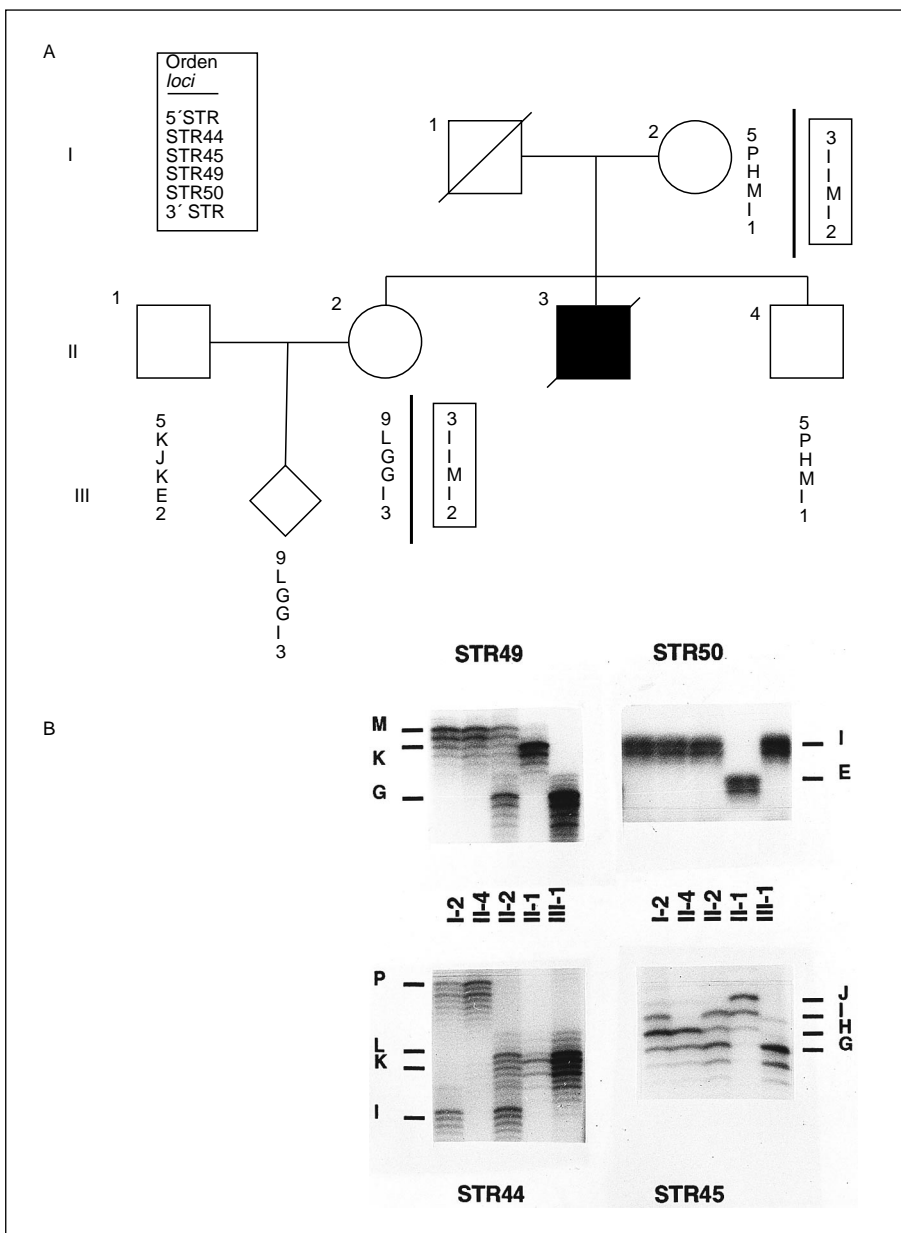
Si se conoce el gen de la enfermedad, se usarán además marcadores *intragénicos*. Es conveniente utilizar, si es posible, más de un marcador intragénico y en ambas posiciones flanqueantes, confeccionándose haplotipos útiles para el control interno de errores; sobre todo en genes de gran tamaño como el de la NF1 o la DMD/B (fig. 9.58).

La *informatividad* de un *locus* marcador es la probabilidad de que en un apareamiento de la población general se obtengan asociaciones útiles entre sus alelos y los del *locus*

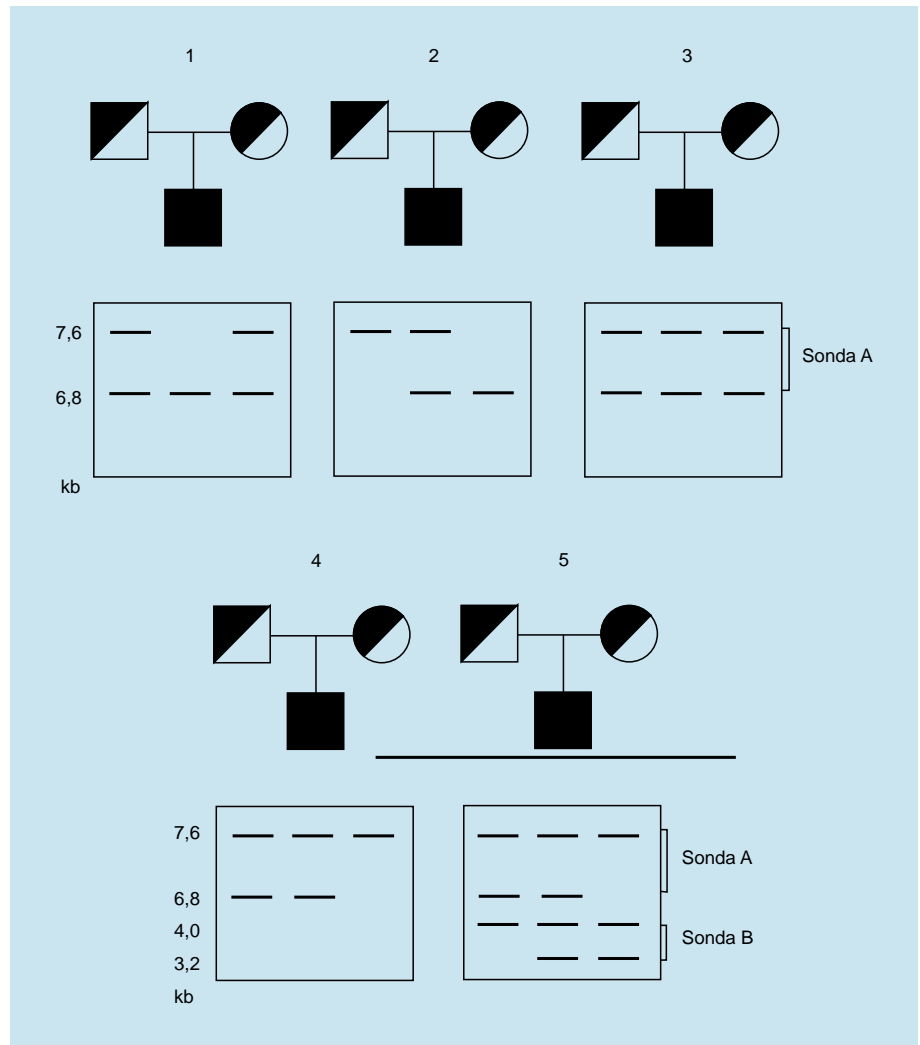




**Fig. 9.57.** Diagnóstico prenatal de anemia drepanocítica, mediante detección de la mutación de la hemoglobina S. A. Transversión CAG → GTG en el codón 6 del gen de la β-globina. La mutación comporta la pérdida de la diana para la enzima de restricción MstII, originándose un fragmento de mayor tamaño al digerirse con esta enzima el producto de una PCR utilizando cebadores (primers) flanqueantes. A: hemoglobina A; S: hemoglobina S. B. Diagnóstico prenatal. PCR seguida de digestión con MstII y electroforesis. El feto es normal (AA).



**Fig. 9.58.** A. Genealogía con un caso índice de distrofia muscular de Duchenne. La madre tiene un 50% de probabilidades de ser portadora (+/d). La consultante embarazada, II-2, hereda el haplotipo de riesgo, no presente en su hermano sano: probabilidad (+/d) ≈ 50%. El feto varón hereda el haplotipo alternativo de no riesgo; se trata de un feto sano con probabilidad > 99,99%. B. Las autoradiografías muestran los microsatélites dinucleotídicos (STR) intragénicos empleados en el estudio.



**Fig. 9.59.** Ejemplos de informatividad para un marcador que detecta dos alelos. 1, informatividad al 100%; 2, no informatividad; 3 y 4, informatividad al 50%; 5, informatividad al 100% combinando las sondas A y B.

morboso, de forma que pueda seguirse la herencia del alelo deletéreo en esa genealogía a través de la herencia de los alelos del marcador (fig. 9.59). Dicha probabilidad depende de las frecuencias de los distintos alelos del marcador y se conoce como PIC (contenido en informatividad de un polimorfismo). Su cálculo se basa en la ley de Hardy-Weinberg (véase Principios del análisis genético, antes citado). Entre los distintos marcadores genéticos (RFLP, VNTR y STRP), los marcadores STRP o microsatélites son los de mayor utilidad y los más empleados en la actualidad, existiendo miles de ellos situados a lo largo de cada cromosoma y en las cercanías o en el interior de la mayoría de los genes.

Otro tipo de diagnóstico indirecto es el que se fundamenta en el *desequilibrio de ligamiento*, especialmente útil en procesos autosómicos recesivos, como la fibrosis quística del páncreas, con gran heterogeneidad mutacional. Es posible calcular el riesgo de ser portador del alelo deletéreo de un individuo de la población general, según las distintas frecuencias de asociación de determinados haplotipos de *loci* marcadores respecto a los alelos normales (+) o deletéreos (*d*). De este modo, consideremos un individuo que posea un genotipo constituido por dos haplotipos, *a* y *b*. Las frecuencias de estos haplotipos en asociación al alelo (+) son, respectivamente,  $f_a$  y  $f_b$ . Las frecuencias de la asociación a los alelos mutados [agrupados ahora todos en (*d*)] son, respectivamente,  $f'_a$  y  $f'_b$ . Una vez analizado el DNA del individuo para descartar las *X* mutaciones más frecuentes (lo que corresponde, en el laboratorio de diagnóstico, a un 60% de las mutaciones del gen de la fibrosis quística), la probabilidad

de ser portador heterocigoto, según el cálculo bayesiano, será:

$$\text{Probabilidad} = 1 / \{1 + 49 / [(1 - X)(f'_a / f_a + f'_b / f_b)]\} \quad [1]$$

Ello puede suponer un drástico cambio en el riesgo de recurrencia de un caso determinado. Si consideramos una asociación preferente de cada uno de los dos haplotipos *a* y *b* con los alelos (*d*) del orden de 100 veces con respecto a su frecuencia en asociación con el alelo (+), entonces según [1] (con  $X = 0,60$ ):

$$\text{Probabilidad (+/d)} = 62\%$$

La probabilidad de que la pareja tenga un niño afectado de mucoviscidosis ahora será:

$$\text{Probabilidad} = 2/3 \times 0,62 \times 1/4 = 10\%$$

En la **tabla 9.15** se relacionan las principales enfermedades para las que es posible el diagnóstico prenatal mediante métodos directos o indirectos.

## Diagnóstico de portadores

La tecnología del DNA constituye el método más adecuado para el diagnóstico de portadores de una enfermedad he-

**TABLA 9.15.** Principales enfermedades para las que se puede realizar diagnóstico molecular directo o indirecto

Enfermedad	Locus	Cromosoma
<b>Gen conocido:</b> análisis mutacional o mediante marcadores de DNA intragénicos		
Déficit de antitrombina III	AT3	1q23-25
Déficit de proteína C	PROC	2q13-14
Síndrome de Waardenburg	PAX3	2q35
Síndrome de Von Hippel-Lindau	VHL	3p26-25
Déficit de proteína S	PROS1	3p11.1-11.2
Retinitis pigmentaria	RHO	3q21-24
Corea de Huntington	IT25	4p16.1
Poliposis colónica familiar	APC	5q21-q22
Síndrome de Gardner	APC	5q21-q22
Hiperplasia congénita suprarrenal	CYP21B	6p21.3
Greig-craneopolisindactilia	GCPS	7p13
Osteogénesis imperfecta	COL1A2	7q21.22.1
Síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV	COL1A2	7q21.22.1
Fibrosis quística	CFTR	7q31
Neoplasia endocrina múltiple	MEN2A	10q21.1
Hipoparatiroidismo tipo I	PTH	11p15
Betahemoglobinopatías	HBB	11p15.5
Tumor de Wilms	WT1	11p13
Aniridia	PAX-6	11p13
Fenilcetonuria	PAH	12q24.1
Enfermedad de Wilson	WND	13q14-21
Retinoblastoma	RB1	13q14.1-2
Déficit de $\alpha$ -antitripsina	PI	14q32.1
Síndrome de Prader-Willi	PWS	15q11
Síndrome de Angelman	AGMS	15q11
Síndrome de Marfan	FBN1	15q21.1
Enfermedad de Tay-Sachs	HEXA	15q23-24
Alfahemoglobinopatías	HBA	16p13
Esclerosis tuberosa 4	TSC4	16p13
Poliquistosis renal del adulto	PKD1	16p13.31
Síndrome de Charcot-Marie-Tooth tipo Ia	PMP22	17p11.2
Síndrome de Li-Fraumeni	P53	17p13.1
Neurofibromatosis 1 (Von Recklinghausen)	NF1	17q11.2
Síndrome de Watson	NF1	17q11.2
Osteogénesis imperfecta	COL1A1	17q21-q22
Síndrome de Ehlers-Danlos tipo VIIA1	COL1A1	17q21-q22
Hipercolesterolemia familiar	LDL	19p13.2
Distrofia miotónica de Steinert	DM	19q13.2-3
Hipertermia maligna	RYR1	19q13.1
Enfermedad de Alzheimer familiar	APP	21q21-q22.1
Neurofibromatosis tipo 2	NF2	22q12
Enfermedad de Norrie	NDP	Xp11.3
Distrofia muscular de Duchenne	DMD	Xp21
Enfermedad granulomatosa crónica	KYBB	Xp21
Síndrome de Kallman	KAL	Xp22.3
Déficit de ornitina-transcarbamilasa	OTC	Xp21
Coroideremia	TCD	Xq13-q21
Síndrome de Alport	COL4A5	Xq22
Síndrome de Lowe	OCRL	Xq25-q26.1
Síndrome de Lesch-Nyhan	HPRT	Xq26-q27.2
Hemofilia B	F9	Xq27.1-q27.2
Hemofilia A	F8C	Xq28
Síndrome de X frágil A	FMR-1	Xq27.3
Síndrome de X frágil E	FRAXE	Xq28
Distrofia adrenoleucocitaria	ALD	Xq28
<b>Gen desconocido:</b> marcadores de DNA cercanos al gen		
Síndrome de Werdnig-Hoffmann	SMA	5q12.2-13.3
Atrofia muscular espinal II	SMA	5q12.2-13.3
Hemocromatosis	HFE	6p21.3
Ataxia de Friedreich	FRDA	9cen-q21
Esclerosis tuberosa 1	TSC1	9q33-q34
Neoplasia endocrina múltiple 1	MEN1	11q13
Ataxia-telangiectasia	ATA	11q22-23
Esclerosis tuberosa 2	TSC2	11q23
Ataxia-telangiectasia	AT	11q22-q23
Esclerosis tuberosa 3	TSC3	12q23.3
Síndrome de DiGeorge	DGS	22q11
Retinitis pigmentaria ligada al sexo	RP2	Xp4.4-p11.2
Retinitis pigmentaria ligada al sexo	RP3	Xp21.2-p11.4
Displasia ectodérmica hipohidrótica	EDA	Xp11-q12

reditaria. El objetivo es detectar a los individuos portadores sanos de enfermedades hereditarias capaces de transmitir las a su descendencia. La estrategia que se utiliza para el diagnóstico de portadores es la misma que se ha descrito para el diagnóstico prenatal. En el diagnóstico de portadores incluimos a las mujeres portadoras de un defecto recesivo ligado al cromosoma X, a los individuos de ambos sexos para las enfermedades autosómicas recesivas y a los sujetos afectados o portadores (sin que hayan desarrollado todavía la enfermedad) de un proceso de herencia autosómica dominante.

En el caso de las enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X, la mitad de las hermanas de un afecto serán portadoras del gen mutado. El análisis de portadoras permitirá evitar el diagnóstico prenatal a todas aquellas cuyos estudios demuestren que no han heredado el gen mutado. De este modo, a las portadoras que se detectan se les podrá ofrecer el diagnóstico prenatal adecuado, libre de las cargas emotivas de la prisa y de la incertidumbre de la informatividad diagnóstica cuando existe un embarazo de por medio.

Un problema adicional en las enfermedades ligadas al cromosoma X es la detección de casos que implican mutaciones nuevas (*neomutaciones* o mutaciones *de novo*). En la distrofia muscular de Duchenne el índice de neomutaciones se aproxima al 30%. Es necesario establecer el nivel en el que se ha producido la mutación en el seno de cada familia, ya que ello condiciona las estrategias para el diagnóstico en cada uno de sus miembros.

En las enfermedades autosómicas recesivas es posible detectar a los heterocigotos, portadores sanos del gen enfermo. Para la mayoría de los procesos recesivos la baja incidencia de éstos no requiere una particular atención al diagnóstico de portadores. Sin embargo, para poblaciones en las que ciertas enfermedades tienen una elevada incidencia, como la talasemia en Grecia, Chipre y Cerdeña o la fibrosis quística en las poblaciones caucásicas, es deseable detectar a los portadores de estas enfermedades, ya que el riesgo de un portador de tener un hijo enfermo es notablemente superior al de la población general. En el caso de la fibrosis quística el riesgo de un hermano de un individuo afecto –diagnosticado portador de la enfermedad– de tener un hijo enfermo es de 1/100, sensiblemente superior al que tendría una pareja de la población general (1/2.500). Así pues, una vez detectados los portadores del gen enfermo en una familia con miembros afectados de fibrosis quística, el estudio en la pareja de cada uno de ellos, de la población general, permitirá reducir o aumentar el riesgo final de la pareja de tener un hijo enfermo de fibrosis quística.

Para la anemia de células falciformes, las betatalasemias y la fibrosis quística es necesario el análisis de portadores en la población general. Para las betatalasemias se ha conseguido una notable reducción de la incidencia de la enfermedad en las comunidades afectadas, y es de esperar que suceda lo mismo con la fibrosis quística, cuando pueda aplicarse un plan de detección que cubra la mayoría de las mutaciones que provocan la enfermedad. En el caso de la fibrosis quística es posible detectar al 50% de los portadores en la población española y al 75% en la población del norte de Europa y de Norteamérica. Para la enfermedad de Tay-Sachs es posible detectar a los portadores en las familias judías askenazi, en las que el proceso tiene una elevada incidencia. Para la fenilcetonuria es posible detectar al 50% de los portadores al conocer las mutaciones que afectan a la mitad de los pacientes.

## Diagnóstico presintomático

Una de las posibilidades diagnósticas de que se dispone en la actualidad es la detección de enfermedades que no se manifiestan en la infancia, sino que empiezan a dar sintomatología a partir de la edad adulta.

Uno de los ejemplos más conocidos es el de la corea de Huntington. Esta enfermedad neurodegenerativa no se manifiesta hasta los 50 años, sin que sea posible detectar la enfermedad, por métodos bioquímicos ni clínicos, antes de que se presenten los síntomas. La enfermedad tiene una transmisión autosómica dominante. El gen de la corea de Huntington se encuentra en el extremo del brazo corto del cromosoma 4, y se ha descubierto el defecto molecular responsable de la enfermedad. La expansión del trinucleótido (CAG)<sub>n</sub> en los individuos enfermos permite disponer de un método diagnóstico para detectar la enfermedad antes de que ésta se manifieste clínicamente. La situación es casi idéntica en la ataxia dominante, uno de cuyos genes está en el cromosoma 6. La determinación de la mutación en individuos no afectados clínicamente supone una sentencia de una enfermedad grave para la que no existe en la actualidad un tratamiento eficaz. Las mismas consideraciones pueden hacerse para la poliquistosis renal del adulto (cromosoma 16) o para la enfermedad de Alzheimer (cromosomas 14, 19 y 21), entre otras.

A pesar de las controversias éticas con respecto al diagnóstico presintomático, el mejor conocimiento del riesgo de padecer un proceso hereditario permitirá el desarrollo de una medicina predictiva que sea eficaz en la prevención de los factores que contribuyen al desarrollo y manifestación de las enfermedades genéticas, abriendo la posibilidad a su corrección y al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

## Diagnóstico de preimplantación

La nueva tecnología molecular abre la posibilidad de realizar diagnósticos en el estadio de preimplantación de un embrión. En los experimentos llevados a cabo ha sido posible aislar una o dos células de un embrión en el estadio de blástula y realizar un diagnóstico genético mediante PCR, implantando posteriormente el embrión que no tiene el defecto genético, el cual ha dado lugar al desarrollo de un feto total-

mente normal. Otra posibilidad es la determinación del sexo (de utilidad en el diagnóstico de enfermedades ligadas al cromosoma X) y/o el diagnóstico de anomalías cromosómicas en los embriones mediante FISH. El diagnóstico de preimplantación se ha empleado con éxito para el diagnóstico de fibrosis quística y en la determinación de sexo para casos de hemofilia A o de distrofia muscular de Duchenne.

El diagnóstico de preimplantación es una posibilidad para las madres de un hijo afecto que fueron esterilizadas posteriormente y que desean tener más hijos o para los casos en los que la pareja valora positivamente la fecundación *in vitro* y el diagnóstico prenatal, frente a la fecundación natural y el diagnóstico prenatal, con posible ulterior interrupción del embarazo.

### Bibliografía especial

- DI LELLA AG, MARVIT J, LIDSKY AS, GUTTNER F, WOO SL. Screening for phenylketonuria mutations by DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Lancet* 1988; i: 497-499.
- ESTIVILL X, CHILLÓN M, CASALS T, BOSCH A, MORRAL N, NUNES V et al. dF508 gene deletion in cystic fibrosis in Southern Europe. *Lancet* 1989; ii: 1.404.
- KRUYER H, MIRANDA M, VOLPINI V, ESTIVILL X. Carrier detection and microsatellite analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophy in Spanish families. *Prenatal Diagnosis* 1994; 14: 123-130.
- LÁZARO C, GAONA A, RAVELLA A, VOLPINI V, CASALS T, FUENTES JJ et al. Novel alleles, hemizyosity and deletions at an Alu-repeat within the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Hum Molec Gen* 1993; 2: 725-730.
- MATILLA T, CORRAL J, MIRANDA M, TROYANO J, MORRISON K, VOLPINI V et al. Prenatal diagnosis of Werdnig-Hoffmann disease: DNA analysis of a mummified umbilical cord using closely linked microsatellite markers. *Prenatal Diagnosis* 1994; 14: 219-222.
- MATILLA T, VOLPINI V, GENÍS D, ROSELL J, CORRAL J, DAVALOS A et al. Presymptomatic analysis of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) via the expansion of a CAG repeat in a large pedigree displaying anticipation and parental male bias. *Hum Molec Gen* 1993; 2: 2.123-2.128.
- MURPHY E, MUTALIK G. The application of Bayesian methods in genetic counselling. *Hum Heredity* 1969; 19: 126-151.
- WEATHERALL DJ. *The new genetics and clinical practice*, 3.ª ed. Oxford, Oxford University Press, 1991.

# Enfermedad neoplásica y patología molecular

F. Real Arribas y X. Estivill Pallejà

En los últimos 15 años una serie de avances espectaculares, estrechamente ligados al desarrollo de técnicas para el análisis de los ácidos nucleicos, ha conducido a la evidencia de que el cáncer es una enfermedad genética, resultante de la acumulación de lesiones moleculares en genes que participan en el control del crecimiento celular.

Los procesos de proliferación y diferenciación celulares se hallan normalmente sometidos al control de moléculas que ejercen efectos activadores o inhibidores. Aquellos genes cuya activación anómala conduce a una lesión neoplásica se denominan protooncogenes, y las formas anormales se conocen como oncogenes. Cuando es la inactivación la que tiene un efecto transformante, se habla de genes supresores. En la [tabla 9.16](#) se relacionan algunos de los principales oncogenes aislados y su localización en el genoma humano.

Los protooncogenes codifican proteínas que desempeñan un amplio espectro de funciones en la célula: factores de crecimiento, receptores para factores de crecimiento y hormonas, moléculas implicadas en la transmisión de señales bioquímicas al núcleo, factores reguladores de la transcripción génica, moléculas implicadas en la interacción célula-

célula, entre otras. Los mecanismos por los cuales puede alterarse la funcionalidad de uno de estos dos tipos de genes son variados e incluyen la mutación puntual, la amplificación génica, la delección génica y el reordenamiento génico.

En general, las alteraciones que llevan a una ganancia de función tienen efecto dominante, y las que conducen a una pérdida de función tienen efecto recesivo. Sin embargo, existen situaciones de pérdida de función que tienen carácter dominante y reflejan mecanismos más complejos.

## Virus, oncogenes y cáncer

La primera evidencia que indicaba que los virus podían producir cáncer fue obtenida a principios de este siglo por ELLERMAN, BANG (en el estudio de leucemias de pollo) y ROUS (en el estudio de un sarcoma de pollo), al demostrar que filtrados acelulares de estos tumores eran oncogénicos. Experimentos posteriores confirmaron que en ambos

**TABLA 9.16.** Principales oncogenes en el genoma humano y localización cromosómica

Oncogén	Localización
N-RAS	1p22
L-MYC	1p32
LYM	1p32
TCK	1p35
FGR	1p36
TRK	1q31-q41
SKI	1q22-q24
REL	2q13-cen
N-MYC	2p24
RAF1	3p25
KIT	4q11-q22
FMS	5q33
SYN	6q21
MYB	6q22
ROS-1	6q22-q23
MAS-1	6q24-q27
ERB-B	7p14-p12
RAL	7p22-p15
MET	7q31
LYN	8q13-qter
MOS	8q11
MYC	8q24
ABL	9q34
RET	10q11
H-RAS1	11p15.5
SEA	11q13
INT2	11q13
BCL1	11q13.3
ETS1	11q23.3
K-RAS2	12p12.1
INT1	12pter-q14
FOS	14q24q31
AKT1	14q32.3
FES	15q25-q26
P53	17p13
ERBB1	17q11.2
ERBB2/NEU	17q21-22
BCL2	18q21.3
YES1	18q21.3
MEL	19p13-q13
SRC	20q12-q13
ETS2	21q22
BCR	22q11
SIS	22q12.3-q13.1
RAF1	Xp13-p11
MCF2	Xq27

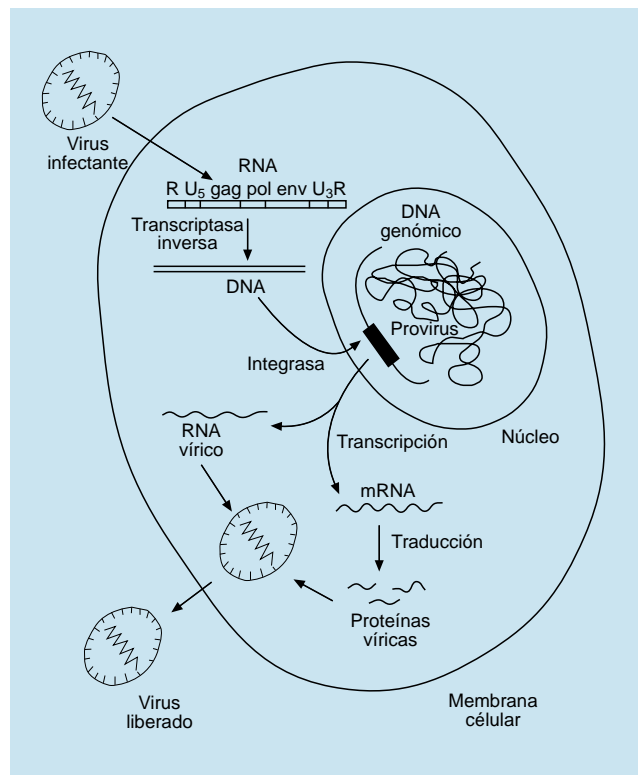
casos era un virus RNA el responsable de la enfermedad. El virus del sarcoma de Rous (RSV) se ha constituido en el clásico ejemplo de retrovirus transformante. Los virus oncogénicos pueden subclasificarse de acuerdo con la naturaleza del ácido nucleico que transporta su información genética en virus RNA (retrovirus) y virus DNA. Esta clasificación es útil porque los mecanismos utilizados por ambos tipos de virus para producir tumores son completamente diferentes. Obviamente, no todos los virus tienen potencial oncogénico.

### Retrovirus oncogénicos

Los retrovirus se caracterizan por tener como material genético dos copias de un RNA de hebra simple de 3,5 a 9 kb de tamaño. Los retrovirus aprovechan la maquinaria de síntesis de DNA y de proteínas de la célula infectada y su reducido genoma contiene típicamente tres genes que son imprescindibles para la formación de nuevos viriones: *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifica la proteína de la cápside vírica; el gen *pol* codifica para la transcriptasa inversa, una enzima capaz de sintetizar una cadena de DNA complementaria a la del RNA vírico; el gen *env* codifica la glucoproteína de la cubierta vírica, que es la responsable de la interacción con la

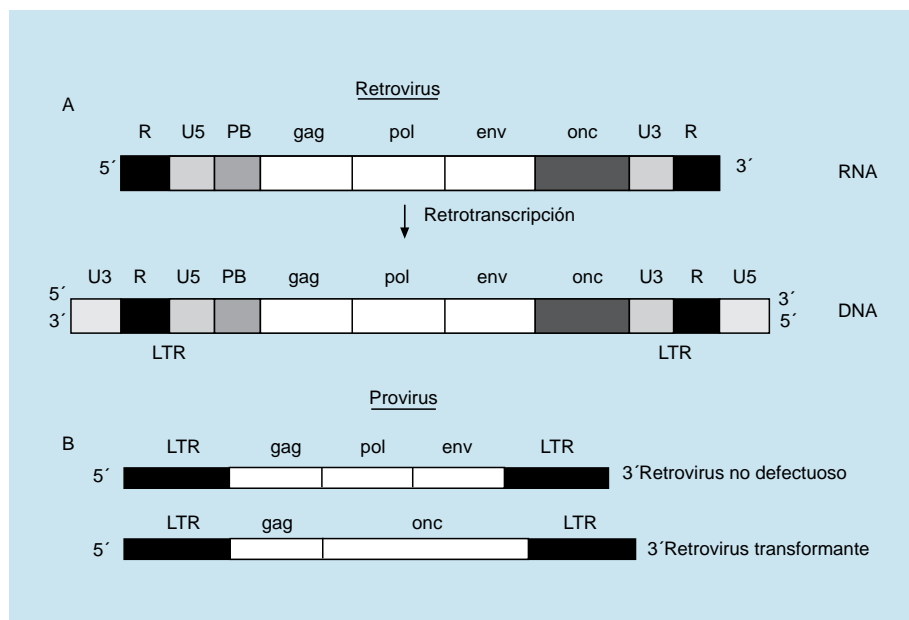
célula diana. En los extremos 5' y 3' se encuentran, respectivamente, secuencias cortas denominadas U5 y U3, así como una secuencia común a los dos extremos denominada "r". Durante la replicación del genoma vírico a DNA de doble hebra estas secuencias dan origen a una estructura U3-r-U5 que se halla en los dos extremos del DNA vírico y que se conoce como LTR (del inglés, *long terminal repeat*). Los LTR constituyen secuencias reguladoras e incluyen señales para el inicio y el final de la transcripción génica. Una vez que un retrovirus se ha adsorbido a la membrana celular, se internaliza y la célula está infectada. La transcriptasa reversa vírica sintetiza en el citoplasma una copia de DNA complementario (-) del DNA vírico (+) y posteriormente se sintetiza la hebra de DNA (+) y se degrada el RNA vírico. Seguidamente, el DNA de doble hebra provírico se integra en el genoma, y su replicación se producirá cada vez que lo haga el DNA de la célula huésped (fig. 9.60). Las secuencias LTR regulan la transcripción vírica y la propia maquinaria celular de síntesis de proteínas conduce a la producción de las proteínas estructurales víricas necesarias para el ensamblaje de la progenie vírica, que se externaliza por gemación. Los virus capaces de completar este ciclo de infección/replicación se denominan competentes o completos. Algunos retrovirus carecen de alguno de los tres genes especificados y no son capaces de completar el ciclo; se denominan virus defectuosos o incompletos.

El estudio experimental de la capacidad oncogénica de los retrovirus rápidamente reveló diferencias entre el comportamiento de diferentes virus: algunos de ellos inducen neoplasias mucho tiempo (meses) después de la inoculación y sólo en una proporción baja de animales (la mayoría de los retrovirus pertenecen a este grupo); otros inducen neoplasias muy rápidamente (en pocas semanas) en la mayoría de los animales inoculados. Los primeros se denominan virus lentos y los segundos, virus rápidos. Todos los virus



**Fig. 9.60.** Ciclo de los retrovirus. El virus RNA se copia en DNA mediante la transcriptasa inversa, pudiendo ser integrado en el genoma de la célula huésped. La transcripción origina la síntesis del RNA del genoma vírico y de las proteínas víricas, liberándose posteriormente el virus.





**Fig. 9.61.** A. Esquema de la organización del genoma de los retrovirus y de los provirus tras la retrotranscripción. B. Esquema del genoma de un retrovirus normal y de un retrovirus transformante que ha incorporado un oncogén. LTR: long terminal repeat.

lentos son virus competentes. Por el contrario, los virus rápidos son defectuosos con una sola excepción, el RSV descrito anteriormente.

En los años setenta, BISHOP, VARMUS et al demostraron que retrovirus rápidos contenían secuencias de DNA que eran complementarias de otras presentes en el DNA normal de células de diferentes especies animales. Un análisis detallado de este tipo de retrovirus ha demostrado la presencia de genes imprescindibles para el mantenimiento de la actividad oncogénica que tienen secuencias homólogas en especies superiores. Estos genes han sido transducidos al genoma vírico durante la infección vírica a lo largo de la evolución y su incorporación se ha acompañado de la pérdida de otros genes víricos para poder mantener un ácido nucleico de reducido tamaño. Durante este proceso, algunos de los genes transducidos han acumulado alteraciones estructurales, y aquellas que implicaban un aumento de la capacidad oncogénica han sido seleccionadas en el curso del tiempo (fig. 9.61). Las secuencias del genoma celular transducidas se han denominado protooncogenes o genes *c-onc*, mientras que las secuencias víricas se conocen como *v-onc*. Cada oncogén retrovírico representa también a un protooncogén celular (tabla 9.17).

Si bien no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales los retrovirus lentos provocan neoplasias, en algunos casos su integración se produce cerca de genes importantes para el control de la proliferación/diferenciación celular. En la tabla 9.17 se muestran ejemplos de estos casos. En otras situaciones, una proteína codificada por el genoma vírico puede activar la expresión de genes celulares que son importantes en la regulación de los procesos de proliferación celular. Los retrovirus rápidos, por el contrario, son portadores de los genes oncogénicos y son mucho más efectivos en la inducción de tumores, si bien esto los convierte en virus defectuosos para la replicación. En la figura 9.62 se esquematizan los distintos mecanismos oncogénicos de los retrovirus. Entre los retrovirus lentos cabe destacar el virus de la leucemia de las aves (ALV), del ratón (MuLV) y del gato (FeLV), el virus de los tumores de mama del ratón (MMTV) y los virus causantes de algunos síndromes linfoproliferativos que ocurren en humanos (HTLV-I y II).

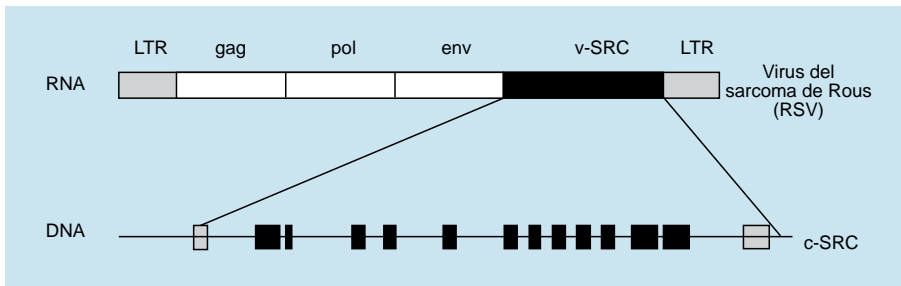
El primer oncogén descubierto en un retrovirus fue el gen *v-src* del virus RSV, causante de sarcomas en el pollo. El gen *v-src* y su homólogo celular *c-src* codifican una proteína con actividad tirosinasa. La única diferencia entre el gen

*v-src* y el gen *c-src* es que el primero no tiene secuencias intrónicas (fig. 9.62).

¿Qué tipo de proteínas codifican los genes que han sido incorporados por los retrovirus de tipo rápido? En general los *v-onc* codifican proteínas importantes en el control de la proliferación celular. Así, el gen *v-sis*, del virus del sarcoma del mono, es homólogo del *c-sis* y codifica la cadena β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). El gen

**TABLA 9.17.** Principales oncogenes descubiertos en los retrovirus

Oncogén	Virus	Especie	Tumor	Transformación
ABL	MLV	Ratón	Leucemia pre-B	Aguda
ERB-A	AEV	Pollo	Eritroblastosis	Aguda
ERB-B	AEV	Pollo	Sarcoma	Aguda
ERB-B	ALV	Pollo	Eritroblastosis	Lenta
ETS	AMV	Pollo	Mieloblastosis	Aguda
FES	FuSV	Gato	Eritroblastosis	Aguda
FGR	FeSV	Gato	Sarcoma	Aguda
FMS	FeSV	Gato	Sarcoma	Aguda
FMS	FMLV	Ratón	Mieloblastosis	Lenta
FOS	MSV	Ratón	Osteosarcoma	Aguda
INT-1	MMTV	Ratón	Mama	Lenta
INT-2	MMTV	Ratón	Mama	Lenta
KIT	FeSV	Gato	Sarcoma	Aguda
MYB	AMV	Pollo	Mieloblastosis	Aguda
MYB	MLV	Ratón	Eritroblastosis	Lenta
MYC	MC29	Pollo	Mieloma	Aguda
MYC	ALV	Pollo	Linfoma B	Lenta
MYC	FeLV	Gato	Linfoma T	Lenta
MOS	MSV	Ratón	Sarcoma	Aguda
PIM-1	MCF	Ratón	Linfoma T	Lenta
RAF	MSV	Ratón	Sarcoma	Aguda
H-RAS	Ha-MSV	Rata	Sarcoma	Aguda
K-RAS	Ki-MSV	Rata	Eritroleucemia	Aguda
REL	REV	Pavo	Sarcoma	Aguda
ROS	ASV	Pollo	Reticuloendoteliosis	Aguda
SIS	SSV	Mono	Sarcoma	Aguda
SKI	SKV	Pollo	Sarcoma	Aguda
SRC	RSV	Pollo	Carcinoma escamoso	Aguda
YES	ASV	Pollo	Sarcoma	Aguda



**Fig. 9.62.** Genoma del virus del sarcoma de Rous (RSV) con el gen v-src, comparado con el gen c-SRC del genoma del pollo. En el primer caso se trata de RNA y en el segundo de un gen DNA con los correspondientes intrones, los cuales están ausentes en la forma v-SRC. LTR: long terminal repeat.

v-erbB, del virus de la eritroblastosis del pollo, es homólogo al gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), si bien la proteína vírica representa una forma trunca- da del receptor normal. Este receptor se encuentra en la membrana celular y adquiere actividad tirosinasa cuando se une al ligando, mientras que la forma trunca- da codificada por el retrovirus está permanentemente activada. Los genes Harvey (H)-RAS y Kirsten (K)-RAS, de los virus del sarcoma de ratón, codifican la proteína RAS p21 (de 21 kilodaltons, kD), localizada en la cara interna de la membrana celular, fijan nucleótidos de guanina y tienen actividad GTPasa. Mientras que las formas normales de la proteína RAS pueden hallarse en estado activo o inactivo en la célula, la proteína RAS p21 vírica presenta una mutación que le confiere actividad permanente. El gen MOS, del virus del sarcoma de Moloney del ratón, codifica una proteína con actividad enzimática serina/treoninasa cuyo homólogo normal se localiza en el citoplasma. El gen MYC, del virus de la mielocitomatosis del pollo, codifica una proteína nuclear que desempeña un papel fundamental en la regulación de la expresión génica y en la proliferación celular. En la **tabla 9.17** se muestran las características de un grupo seleccionado de v-oncogenes y sus características transformantes.

### Retrovirus oncogénicos implicados en cáncer humano

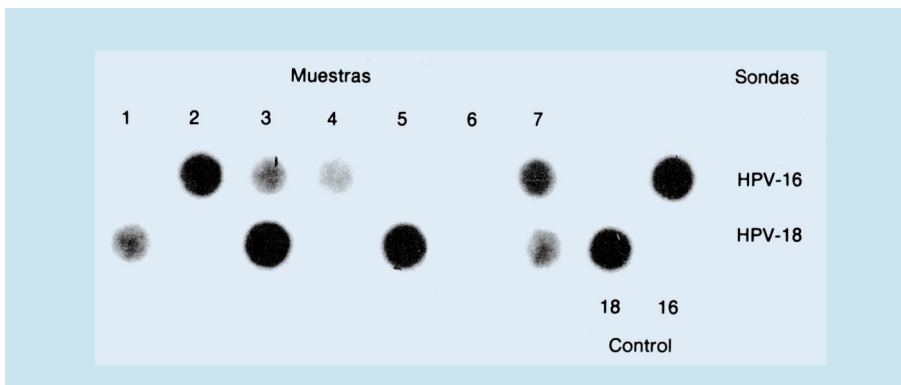
A pesar de que en los últimos años ha quedado claramente establecido que los retrovirus son responsables de algunos procesos patológicos en el hombre, sólo contribuyen a una proporción muy baja de los tumores humanos. Los virus HTLV-I y HTLV-II (del inglés, *human T cell leukemia virus*) son responsables de la leucemia de células T del adulto y de algunos casos de tricoleucemia, respectivamente. Estos dos virus se hallan a medio camino entre los retrovirus agudos y los lentos: no contienen oncogenes víricos ni se caracterizan por un lugar universal de integración en el genoma. El HTLV-I induce neoplasias clonales de células CD4+. Otro grupo de retrovirus, pertenecientes a la familia de los lentivirus,

son los HIV-I y HIV-II (del inglés, *human immunodeficiency virus*) causantes del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Estos virus tienen un genoma relativamente complejo de unas 10 kb e infectan selectivamente las células CD4+. La infección por los virus HIV conduce a una depleción selectiva de la población linfocitaria CD4+ que se manifiesta clínicamente como una inmunodeficiencia severa. Los virus linfotrópicos HTLV y HIV se transmiten por contacto sexual o sanguíneo y de madres a hijos.

### Virus DNA oncogénicos implicados en cáncer humano

En los últimos años también se han acumulado pruebas crecientes que implican a algunos virus DNA en la etiopatogenia del cáncer humano: linfoma de Burkitt y carcinoma nasofaríngeo (virus de Epstein-Barr), el hepatocarcinoma (virus de la hepatitis B) y el carcinoma de cuello uterino (papilomavirus). Estos virus tienen una acción lenta, se integran en el DNA de la célula huésped y carecen de un oncogén transformante. El virus de la hepatitis B puede permanecer de forma crónica en el individuo infectado y desarrollar un hepatocarcinoma 20-30 años después de la infección aguda.

Los papilomavirus se encuentran asociados a diversas neoplasias humanas, especialmente el cáncer de cuello uterino. Existen más de 50 tipos de papilomavirus que se asocian a distintos tipos de lesiones patológicas. Por ejemplo, el HPV-11 se asocia a papilomas y condilomas laríngeos, y el HPV-4, a la verruga vulgar. Por el contrario, los serotipos HPV-16 y HPV-18 se asocian a la neoplasia del cuello uterino. En más del 80% de los casos de esta neoplasia puede detectarse el genoma vírico integrado en las células del tumor, mientras que en las lesiones precancerosas no se encuentra integrado. Algunos productos del genoma vírico pueden interactuar directamente con proteínas celulares (p. ej., la proteína P53) y alterar su función. La PCR permite la detección rápida y sensible de los distintos genotipos de papilomavirus (**fig. 9.63**).



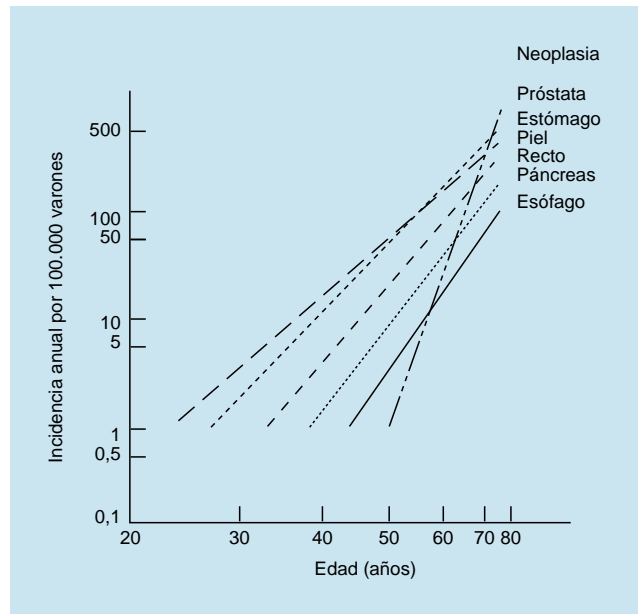
**Fig. 9.63.** Detección de papilomavirus HPV-16 y HPV-18 en muestras cervicales mediante PCR e hibridación con un marcador específico de cada virus. En las muestras 3 y 7 existe infección por ambos tipos de virus, mientras que en la muestra 6 no se observa ninguno de los virus.

## Oncogenes y cáncer humano. Cambios genéticos múltiples conducen al cáncer

El cáncer resulta de la acumulación de alteraciones genéticas somáticas que tienen un patrón particular para cada tipo de tumor (fig. 9.64), como ha sido brillantemente ilustrado por los estudios del grupo de VOGELSTEIN en cáncer de colon. La incidencia de la mayoría de los cánceres humanos aumenta con la edad (fig. 9.65). Así, si bien la exposición a radiación o a carcinógenos químicos está relacionada con el desarrollo de tumores, es necesario que transcurran varios años para que puedan detectarse clínicamente.

La necesidad de que se produzcan lesiones en más de un gen para que se desarrolle un tumor se ha puesto de manifiesto en varios tipos de neoplasias. En el cáncer de colon se ha demostrado que la acumulación de mutaciones en genes específicos conduce primero al desarrollo de un adenoma benigno y, más tarde, a un carcinoma invasivo. El carcinoma de cuello uterino se inicia por la infección por papilomavirus, el cual es portador de dos oncogenes (E6 y E7), que pueden transformar células *in vitro* gracias a que las proteínas E6 y E7 interactúan con los productos de los genes supresores de tumores P53 y RB1. Sólo los subtipos de papilomavirus cuyas proteínas E6 y E7 se unen a RB1 y a P53 están asociados a cáncer de cérvix. Por otra parte, la progresión de las células infectadas hacia el desarrollo de un tumor maligno requiere otras alteraciones moleculares. En el cáncer de colon y en la leucemia mieloide crónica (LMC) está demostrado que la alteración en los genes APC y ABL, respectivamente, anteceden a los cambios que conducen a la progresión tumoral, sugiriendo que existen ciertas prelacones en la acumulación de las lesiones moleculares. Estas observaciones sugieren que las mutaciones que conducen al desarrollo neoplásico se encuentran en las células del individuo durante mucho tiempo, quizá décadas, antes del diagnóstico de la neoplasia.

Los tumores que se detectan en la infancia constituyen una variación del modelo de acumulación de mutaciones en el cáncer. Los estudios de KNUDSON en el retinoblastoma han proporcionado las bases para entender estos tumores, a la vez que han permitido desarrollar el concepto de *genes supresores de tumores*. En el tumor de Wilms y en el retinoblastoma son necesarias dos mutaciones en un gen determinado para que se desarrolle el tumor. Una de estas mutaciones puede ser heredada y la otra somática, o ambas pueden ser somáticas, lo que condiciona el desarrollo unilateral o bilateral del tumor en estos pacientes, a la vez que la transmisión familiar de la mutación.

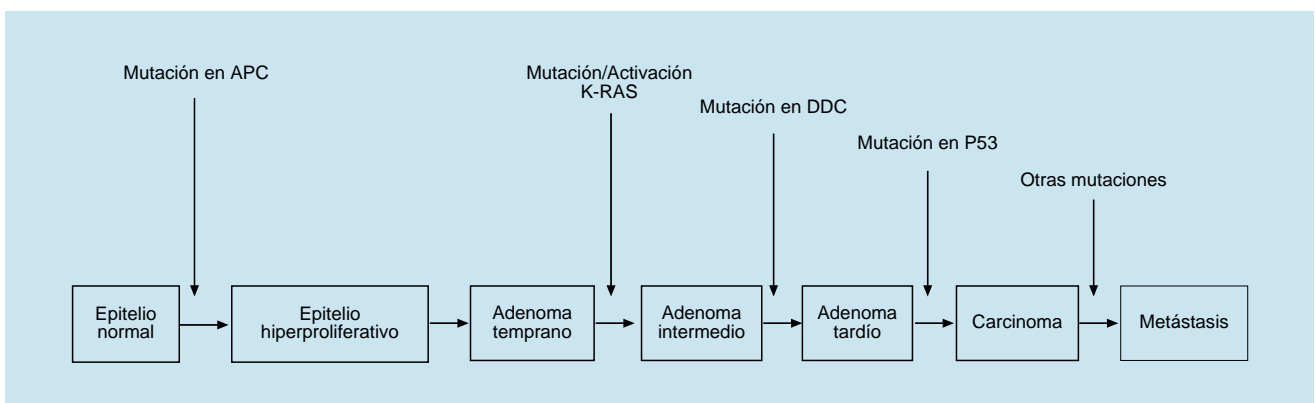


**Fig. 9.65.** Incidencia de cáncer de próstata, estómago, piel, recto, páncreas y esófago en varones de distintos grupos de edades. (Modificada de MILLER DG. *Cancer* 1980; 46: 1.307-1.318.)

Las alteraciones genéticas del DNA descritas hasta el momento pueden subclasificarse en varios tipos: a) mutaciones puntuales en la secuencia codificante; b) deleciones génicas; c) amplificación y/o sobreexpresión génicas; d) reordenamientos genéticos que afectan la secuencia codificante, y e) reordenamientos genéticos fuera de la región codificante. Muy recientemente se ha descrito que mutaciones en algunos genes implicados en la reparación del DNA pueden contribuir de forma importante a la progresión neoplásica, pues su disfunción amplifica la persistencia de errores producidos durante la copia del DNA. Este nuevo mecanismo se ha implicado en el cáncer de colon hereditario que no está asociado a poliposis.

### Mutaciones puntuales: familia de genes RAS

El ejemplo más característico de activación de un oncogén por mutaciones puntuales es el de los genes de la familia RAS. El primer oncogén activado identificado en un tumor humano fue el gen H-RAS, aislado a partir de la línea de cáncer de vejiga urinaria EJ utilizando la técnica de transfección génica. Esta técnica consiste en introducir una serie de fragmentos de DNA en otras células por un medio físico, ya sea



**Fig. 9.64.** Estadios en la progresión de la enfermedad tumoral colorrectal y mutaciones en distintos genes supresores de tumores y oncogenes. (Modificada de FEARON ER y VOGELSTEIN B. *Cell* 1990; 61: 759-767.)

precipitando el DNA con sales de fosfato cálcico que son internalizadas por la célula, insertando el DNA en pequeñas vesículas lipídicas (liposomas) o sometiendo a las células a un campo eléctrico y facilitando así la entrada del DNA. El DNA de las células EJ era capaz de convertir células de ratón no transformadas en células transformadas. Cuando se aisló el fragmento de DNA humano de las células de ratón transformadas y se determinó su secuencia nucleotídica se observó que ésta era homóloga a la del oncogén presente en el virus del sarcoma murino de Harvey (c-H-RAS1). Este gen codifica una proteína denominada RAS que tiene 21.000 daltons de peso molecular y también se conoce como RAS p21. La comparación de las secuencias del gen H-RAS aislado de las células transfectadas con la de células normales reveló que sólo diferían en una base en el codón 12. Esta sustitución hacía que la glicina presente en la proteína normal fuera sustituida por una valina. En el hombre, la familia RAS comprende tres diferentes subfamilias de genes íntimamente relacionadas desde el punto de vista estructural y funcional: c-Harvey-ras (c-H-RAS), c-Kirsten-ras (c-K-RAS) y c-N-RAS. Alteraciones moleculares en estos tres genes se han descrito en tumores humanos y están presumiblemente involucradas en el desarrollo de tumores "espontáneos". Por ejemplo, el gen c-K-RAS está frecuentemente mutado en cáncer de colon y cáncer de páncreas, mientras que c-N-RAS está a menudo mutado en el síndrome mielodisplásico y en la leucemia mieloide aguda. Las bases moleculares de esta especificidad no se conocen con exactitud. Con independencia del gen RAS considerado, la mayoría de las mutaciones identificadas en los tumores humanos se localizan en los codones 12, 13, 59, 61 y 63, lo que sugiere que estos codones se hallan en regiones funcionalmente importantes de la proteína.

¿Qué función tienen los genes de la familia RAS? Las proteínas RAS p21 son similares a las proteínas G, tienen actividad GTPasa y se localizan en la cara interna de la membrana plasmática. Cuando RAS p21 está unida a GTP, la proteína se halla activada, y cuando el GTP es hidrolizado a GDP, se produce la transición a la forma inactiva. El intercambio de GDP por GTP, favorecido por ciertas proteínas asociadas a RAS p21, conduce de nuevo a la activación de ésta. Las mutaciones descritas en los genes de la familia RAS confieren a la proteína anormal la capacidad de permanecer unida a GTP (fig. 9.66) y, por tanto, mantener el estado activado. Los aminoácidos 12-13 y 59-63 están implicados en la unión a nucleótidos de guanina y en su hidrólisis.

Los datos actuales indican que las alteraciones en los protooncogenes de la familia RAS son el resultado de mutaciones somáticas que se producen durante el proceso de carcinogénesis. En el cáncer de colon parecen constituir un acontecimiento molecular relativamente temprano: las muta-

ciones en el protooncogén c-K-RAS pueden detectarse en adenomas, tumores benignos que, en algunos casos, evolucionan a un carcinoma de colon. En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos moleculares para la detección de mutaciones en los genes de la familia RAS que son a la vez más sensibles y más sencillos que la transfección génica, basados en la tecnología de amplificación del DNA mediante PCR.

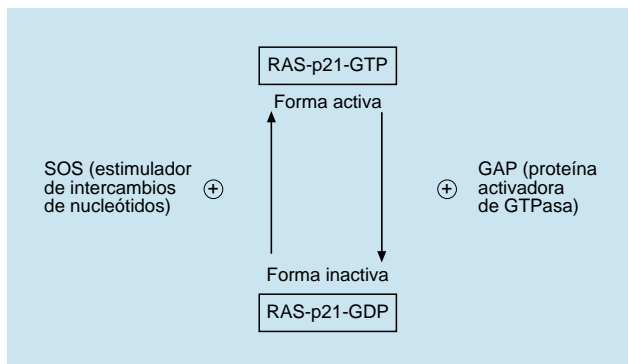
## Genes supresores del cáncer: P53

El gen P53 (localizado en 17p13.1) ha sido objeto de amplio estudio en los últimos años y parece estar implicado en más del 50% de las neoplasias humanas en forma de mutaciones y deleciones. La proteína codificada por este gen fue identificada gracias a su capacidad para unirse al antígeno T del virus SV40 e inducir una respuesta inmunológica en animales portadores de tumores inducidos por este virus o por el carcinógeno metilcolantreno A. Inicialmente descrita como un oncogén, datos de los últimos años indican que la molécula P53 normal es en realidad un gen supresor de tumores recesivo, mientras que las formas mutadas de P53 actúan como oncogén dominante. La proteína P53 normal tiene una vida media muy corta (30 min) y ejerce sus efectos en forma de oligómeros que participan en diversas funciones celulares: control del ciclo celular, reparación y síntesis del DNA, control de la diferenciación celular y regulación de la muerte celular programada (apoptosis). El pleiotropismo de acción de P53 está relacionado con su capacidad de actuar como factor regulador de la transcripción de otros genes (tanto de forma positiva como negativa). Se ha propuesto que P53 actúa como controlador de la calidad del DNA y que, cuando ésta es deficiente, P53 impide la proliferación celular. Las formas mutadas de P53 pueden formar parte de complejos oligoméricos, inactivándolos, y así secuestrar P53 normal e inhibir su funcionalidad (este mecanismo convierte a P53 mutada en un oncogén dominante). Asimismo, existen evidencias de que algunas mutaciones de P53 pueden conferir a la proteína nuevas actividades reguladoras de transcripción (fig. 9.67).

Las mutaciones en el gen P53 son frecuentes en la mayoría de los tumores humanos, y datos preliminares en varios tipos de neoplasias sugieren que su presencia se acompaña de un peor pronóstico clínico (p. ej., cáncer de pulmón y de mama). Al contrario que en el caso de los genes RAS, las mutaciones inactivantes de P53 se producen en una región mucho más amplia del gen (si bien se localizan sobre todo en cinco dominios altamente conservados de la proteína que se supone son importantes para su función) (fig. 9.68). La mayoría de las mutaciones conducen a sustituciones de un aminoácido y a un aumento de la vida media de la proteína y de los niveles totales de P53 celular. Dado que el polimorfismo de las mutaciones de P53 es muy amplio y que cada carcinógeno tiene un efecto mutagénico específico, el estudio del espectro de las mutaciones de P53 en un tumor determinado puede proporcionar hipótesis sobre los carcinógenos implicados en su desarrollo (cada carcinógeno deja una huella particular). Estas consideraciones hacen que P53 se haya convertido en objeto de numerosos estudios de epidemiología molecular en la actualidad.

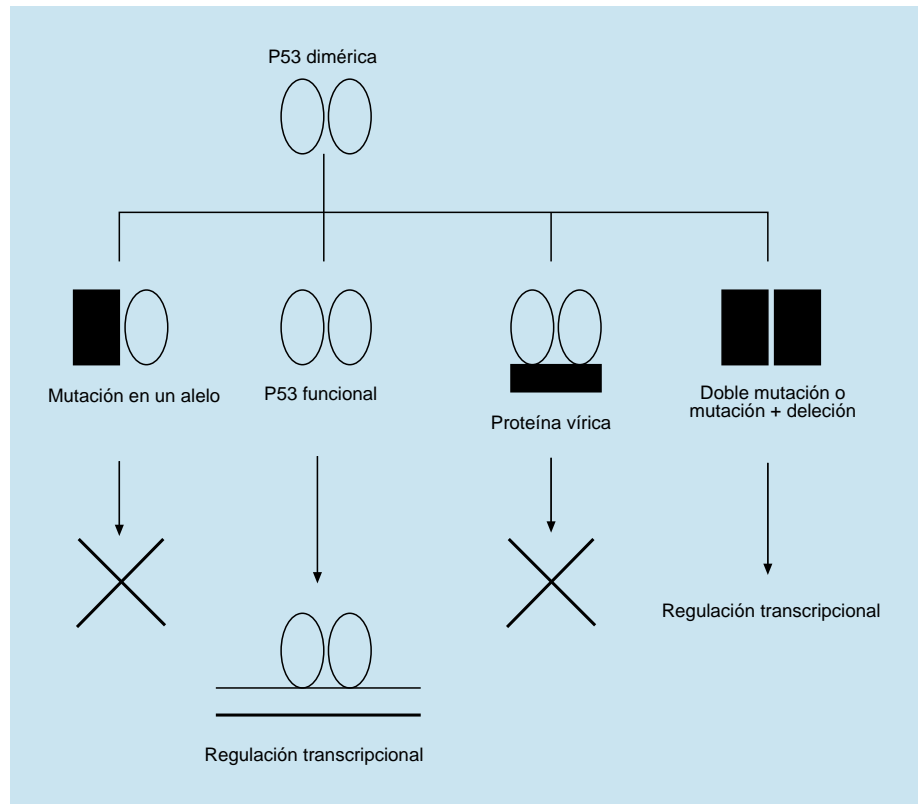
## Amplificación y/o sobreexposición génicas

Si bien las alteraciones cualitativas en la estructura o niveles de expresión génica han sido objeto de constante investigación, son muchas más las alteraciones cuantitativas descritas en la literatura. Varios mecanismos pueden conducir a un aumento de concentraciones de una determinada proteína: amplificación del número de copias del gen que la codifica, aumento de los niveles de transcripción de mRNA, aumento

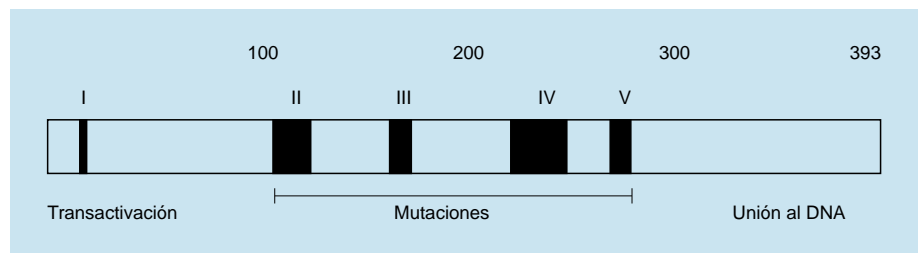


**Fig. 9.66.** Actividad GTPasa de las proteínas p21 de los genes de la familia RAS. La proteína normal está activada cuando se une al nucleótido GTP; una vez que este nucleótido es hidrolizado a GDP, RAS p21 pasa a estar en la forma inactiva. La actividad GTPasa es regulada por diversas proteínas (p. ej., GAP y SOS). Las formas mutadas de RAS p21 están permanentemente activadas y, por tanto, unidas al nucleótido GTP.

**Fig. 9.67.** La proteína P53 normal tiene una vida media corta y ejerce su efecto en forma de oligómeros (representado como dímeros). Las formas mutadas de la proteína P53 tienen una vida media más larga y retienen su capacidad de formar oligómeros con P53 normal. De esta manera, la secuestran e impiden que ejerza sus efectos normales de regulación de la transcripción génica. Ello explica que P53 funcione como un oncogén dominante. Las formas de P53 mutada podrían tener también capacidad reguladora de la transcripción propia actuando como un oncogén dominante. P53 puede unirse a proteínas víricas, produciéndose diversos tipos de alteraciones en su funcionamiento normal.



**Fig. 9.68.** Mapa esquemático de los dominios funcionales de P53 así como las regiones de la proteína altamente conservadas (I-V). La mayoría de las mutaciones detectadas en tumores humanos se producen en las regiones II-V.



de la vida media del mRNA o aumento de la vida media de la proteína.

La amplificación génica consiste en un aumento del número de copias de un gen determinado. En muchas ocasiones el número de copias es bajo, pero en otras es tan alto que puede manifestarse a nivel citogenético en forma de diminutos dobles (pequeños pseudocromosomas que carecen de centrómero) o de regiones cromosómicas de tinción homogénea (HRS, del inglés, *homogeneously stained regions*). En la **tabla 9.18** se indican algunos de los protooncogenes cuya amplificación a nivel génico ha sido descrita en tumores humanos. En la mayoría de los casos de amplificación de oncogenes, éstos son aparentemente normales, por lo que parece que en general las mutaciones no acompañan a la amplificación. En algunos casos la amplificación génica representa un hallazgo esporádico en un tumor, pero en otros se trata de una alteración reproducible en tumores de diferentes pacientes. La amplificación del protooncogén N-MYC se ha descrito en el neuroblastoma, el retinoblastoma y el carcinoma de células pequeñas de pulmón. En el neuroblastoma se detecta en el 20% de los casos y se ha descrito una asociación entre el grado de amplificación, el estadio y el pronóstico clínico (a mayor amplificación, más alto estadio y peor pronóstico).

El gen c-ERBB1, que codifica el receptor EGF, se encuentra sobreexpresado en diversos tipos de tumores, pero su am-

**TABLA 9.18.** Protooncogenes y amplificación génica

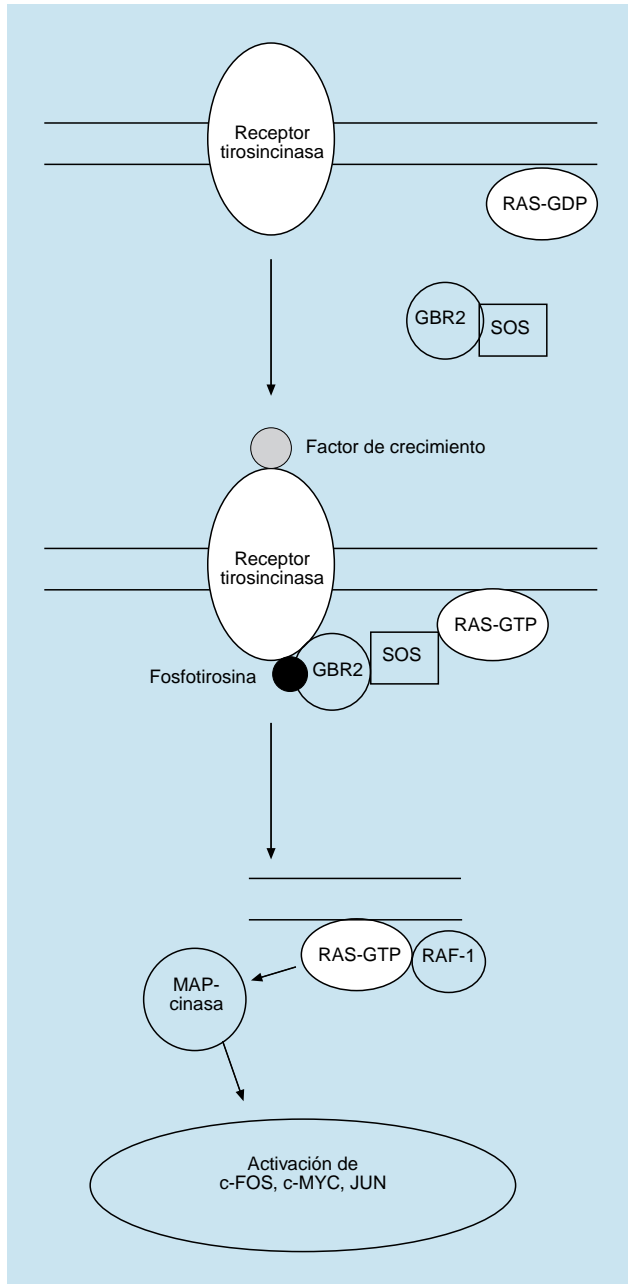
Protooncogén	Neoplasia
N-MYC	Neuroblastoma, retinoblastoma, carcinoma pulmón
L-MYC	Carcinoma pulmón
MYC	Carcinoma colon, estómago, pulmón; leucemia promielocítica
ABL	Leucemia mieloide crónica
ERBB1	Glioblastoma, carcinoma escamoso
ERBB2	Carcinoma mama, carcinoma estómago
MET	Carcinoma estómago

plificación génica se ha descrito sobre todo en carcinomas escamosos y en tumores cerebrales. Del mismo modo, el gen c-ERBB2 se encuentra sobreexpresado en múltiples tumores y la amplificación génica se ha descrito en algunos casos de adenocarcinoma de mama y de estómago. Diversas observaciones sugieren que cualquiera que sea el mecanismo que conduce a la sobreexposición de la proteína oncogénica, el efecto funcional es semejante. En algunos casos la amplificación génica se acompaña de otras alteraciones moleculares, como reordenamientos génicos, que conducen a la síntesis de proteínas truncadas que pueden tener mayor potencial transformante por estar constitutivamente activadas (p. ej., los protooncogenes c-ERBB1 y c-MET).



## Factores de crecimiento y sus receptores como protooncogenes

Múltiples observaciones sugieren que factores de crecimiento, hormonas o sus receptores pueden desempeñar un papel crucial en el proceso de transformación neoplásica. Por una parte, algunos v-ONC y protooncogenes correspon-



**Fig. 9.69.** Esquema de la activación de la transcripción génica como consecuencia de la interacción de factores de crecimiento con sus receptores tirosincinasa. Este esquema integra la forma en que RAS p21 participaría en la conexión de estos receptores con la vía de las serina-treonincinasas activadas por mitógenos (MAP). (Adaptada de MARX J. Science 1993; 260: 1.588-1.590.) En ausencia del factor de crecimiento (panel superior), el receptor no está fosforilado, RAS p21 está unida a GDP y el complejo GRB-SOS se halla en el citoplasma. Cuando el ligando se une al receptor (panel central), se activa la tirosincinasa, se produce la autofosforilación del receptor, y el complejo GRB-SOS se une al receptor de membrana. Ello conduce al intercambio de GDP por GTP. RAS p21 activado puede unirse a RAF-1 e inducir la activación de la vía de las cinasas de serina-treonina tipo MAP, que conduce a la transcripción génica en el núcleo (panel inferior).

den a genes que codifican factores de crecimiento [p. ej., v-sis es homólogo al gen de la cadena  $\beta$  del PDGF, y el protooncógeno HST está relacionado con el gen del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF)]. Por otra parte, otros protooncogenes codifican receptores de membrana de tipo tirosincinasa que tienen capacidad de unirse a factores de crecimiento. Entre ellos cabe destacar los genes c-ERBB1 (que codifica una molécula capaz de fijarse al EGF, TGF alfa, anfirregulina y cripto), c-ERBB2 (codifica el receptor de herregulina), c-MET [codifica el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)] y c-FMS [codifica el receptor del factor estimulante de colonias hematopoyéticas (CSF-1)]. Todos estos receptores constan de una región extracelular por la que se unen al ligando, una región transmembrana y una región intracitoplasmática con actividad tirosincinasa. En general, la unión del ligando al receptor activa el dominio cinasa y se produce la autofosforilación del receptor. Datos muy recientes indican que la fosforilación en tirosina en el dominio citoplasmático del receptor aumenta la afinidad de éste por una molécula denominada GRB (del inglés *growth factor receptor-binding protein*) que se encuentra normalmente en el citoplasma unida a SOS, que es una molécula que estimula el intercambio de nucleótidos de guanina. La interacción del complejo GRB-mSOS con fosfotirosina permite que SOS se una a RAS p21 (ubicado en la cara interna de la membrana celular) activándola al estimular el intercambio de GDP por GTP. Entonces, RAS p21 activado podría, a través de una o más moléculas intermediarias, estimular la actividad de una cascada de serina/treonincinasas conocida como cinasa tipo MAP (del inglés, *mitogen activated protein*). Finalmente, algunas de las enzimas implicadas en estas vías podrían activar a factores reguladores de la transcripción (p. ej., c-MYC) e inducir (o inhibir) la expresión génica (fig. 9.69).

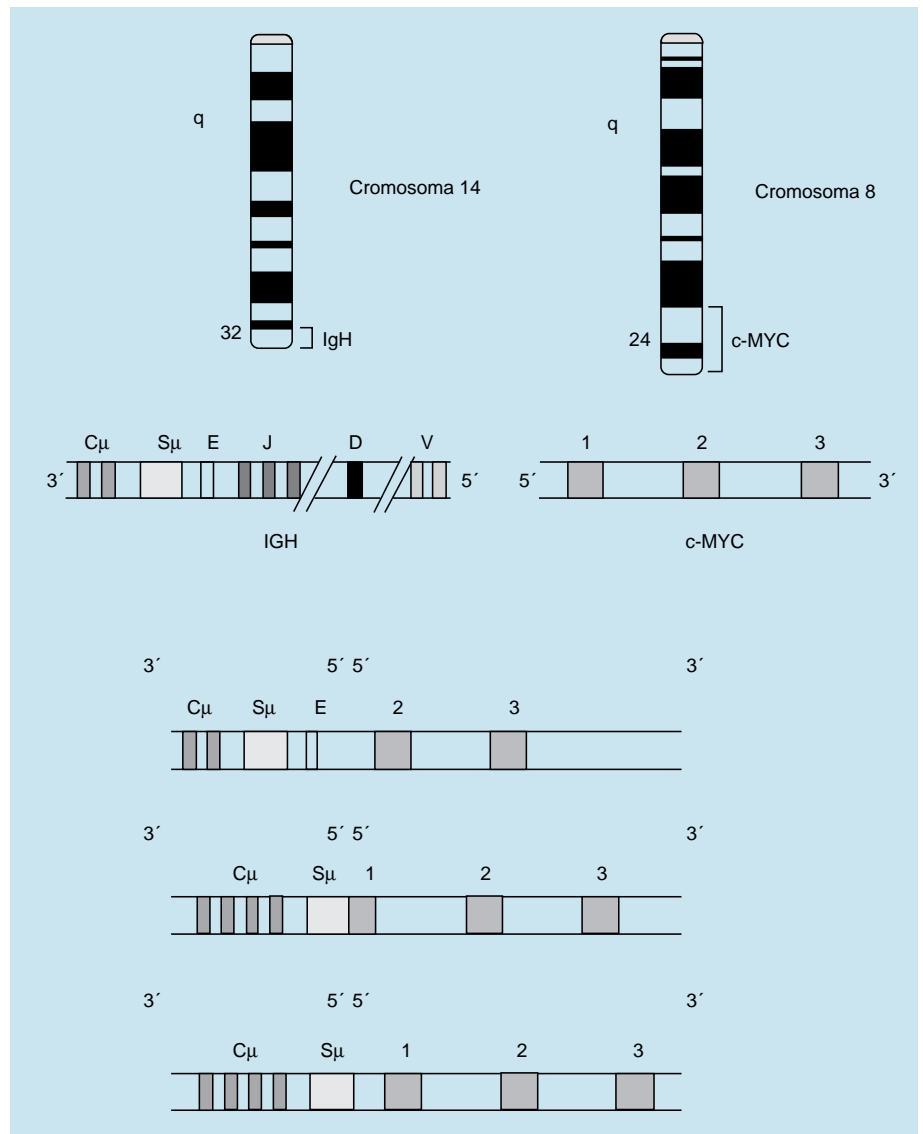
Este esquema explica cómo la activación anómala de genes que codifican receptores de factores de crecimiento de tipo polipeptídico está interconectada con otras proteínas oncogénicas (como los genes RAS) y puede conducir a la transformación neoplásica. También se han implicado los receptores de hormonas no polipeptídicas en la oncogénesis. Dos ejemplos son el receptor de las hormonas tiroideas, cuyo gen es homólogo al del oncógeno retroviral v-ERBA, y uno de los genes del receptor de ácido retinoico (que se halla translocado en la leucemia promielocítica).

## Alteraciones cromosómicas y cáncer

La mayoría de las leucemias tienen alteraciones cromosómicas específicas. En los linfomas y en los carcinomas el número de alteraciones acumuladas en la progresión maligna es todavía mayor que en las leucemias. Una de las áreas de mayor desarrollo en la biología y la genética del cáncer ha sido el estudio de la relación entre alteraciones cromosómicas identificadas en células neoplásicas y los genes implicados en la génesis tumoral. Los lugares de rotura en dos cromosomas distintos y el punto de unión indican regiones en las que se encuentran genes que podrían estar relacionados con la génesis o progresión tumoral. El gen implicado en el crecimiento tumoral puede ser trasladado de su localización habitual hacia otro cromosoma, o puede permanecer en su posición original, con el punto de rotura cromosómica situado en un lugar próximo a él. Ejemplos clásicos de esta situación se hallan en el linfoma de Burkitt t(8;14) o en la LMC t(9;22), en los que las translocaciones afectan a protooncogenes conocidos. De este modo se han identificado varios de los oncogenes implicados en neoplasias hematológicas (tabla 9.19). Las translocaciones cromosómicas pueden tener distintos efectos: alterar el patrón de expresión de la proteína para la que el gen implicado codifica o alterar el producto proteico final.

**TABLA 9.19.** Principales oncogenes, translocaciones y regiones cromosómicas implicadas en neoplasias hematológicas

Oncogén implicado	Neoplasia	Translocación/localización	Gen	Oncogén implicado	Neoplasia	Translocación/localización	Gen
C-ABL	Leucemia mieloide crónica	t(9;22)	bcr	TCF-3	Leucemia linfoblástica aguda	19p13.3	
C-ABL	Leucemia linfocítica aguda	t(9;22)	bcr				
C-ABL	Linfoma T	t(7;9)	TCRβ				
C-BCL-1	Linfoma B	t(11;14)	IgH	TCF-1	Leucemia mieloide aguda	Xp21	CSF2Rα
C-BCL-1	Leucemia linfocítica crónica	t(11;14)	IgH				
C-BCL-2	Linfoma folicular	t(14;18)	IgH				
C-ETS-1	Leucemia monocítica aguda	t(9;11)	IFNβ	HOX11 (TCL-3)	Leucemia linfocítica aguda T	10q23	
C-ETS-1	Leucemia aguda	t(4;11)	IgJ				
C-ETS-2	Leucemia aguda	t(8;21)	?				
C-MYC	Linfoma de Burkitt	t(8;14)	IgH	TCL-5	Leucemia linfoblástica aguda T	1p32	
C-MYC	Linfoma de Burkitt	t(8;22)	Ig				
C-MYC	Linfoma de Burkitt	t(2;8)	Ig				
C-MYC	Leucemia aguda de células T	t(8;14)	TCRγ	c-BCL-3	Leucemia linfocítica crónica	19q13	
C-TCL-1	Leucemia T	t(11;14)	TCRγ				
C-TCL-4	Leucemia/linfoma de células T	2q34					
C-TCL-1	Leucemia/linfoma de células T	14q32.1					
C-TCL-1	Leucemia/linfoma de células T	14q11.2	TCRα				
C-AML-1	Leucemia mieloide aguda	21q22					



**Fig. 9.70.** Mecanismo molecular de la translocación  $t(8;14)$  del linfoma de Burkitt. En la parte superior se indican la localización cromosómica de los genes y su estructura molecular. En la parte inferior se representan tres fusiones distintas de los genes MYC y  $C\mu$  de la IgM.

## Translocaciones cromosómicas, MYC y linfoma de células B

En las neoplasias de células B, como el linfoma de Burkitt, se han observado translocaciones específicas que afectan al protooncogén MYC. El *locus* para el protooncogén MYC está situado en la región q24 del cromosoma 8. Se han descrito tres translocaciones específicas en el linfoma de Burkitt: con la región 14q32 (75% de los casos), con la región 2p12 (20%) o con 22q11 (5%). Estas regiones contienen los *loci* para los genes C de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas y para los genes V y C de las cadenas ligeras kappa, o los genes V y C de las cadenas ligeras lambda, respectivamente (figs. 9.70 y 9.71).

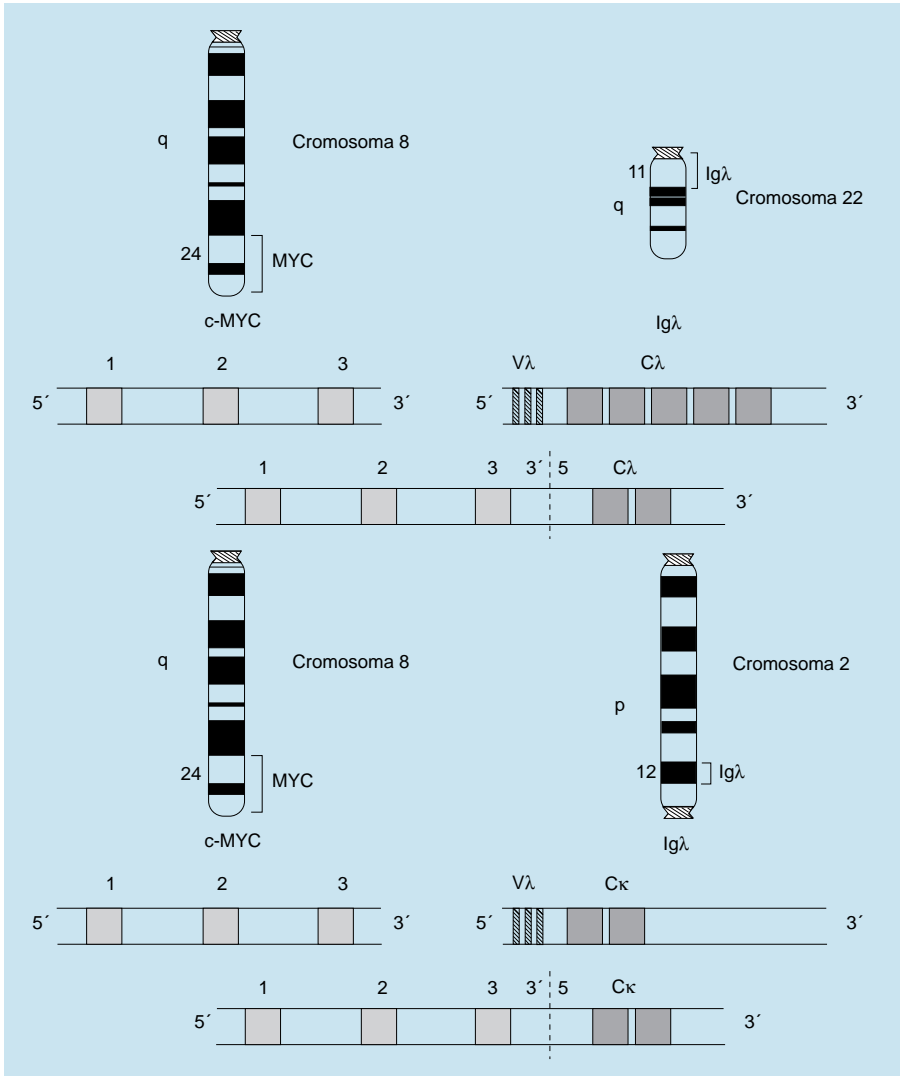
Las consecuencias de estas translocaciones no son bien conocidas. Si bien no existe un incremento en la expresión del MYC en todos los casos, la translocación puede ser responsable de algún tipo de disregulación en el seno del gen. De cualquier forma, las translocaciones que se producen parecen alterar la expresión de MYC, el cual se expresa de forma elevada o fuera de las fases G0 y G1 del ciclo celular. El caso del linfoma de Burkitt ha servido de modelo en la investigación del potencial neoplásico de las translocaciones cromosómicas, permitiendo descubrir otros oncogenes: BCL1 t(11;14) en la leucemia linfocítica crónica, BCL2 t(14;18) en el linfoma folicular y TCL1 (11;14) en la leucemia de células T, entre otros (tabla 9.19). Del mismo modo, MYC se ha implica-

do en leucemias de células T en los casos de translocaciones con el gen de la cadena  $\gamma$  del receptor para células T (14q11).

## Linfoma folicular y distintas etapas de la transformación maligna

El linfoma folicular puede presentar varias alteraciones cromosómicas, entre las cuales la más frecuente es la translocación t(14;18) (q32;q21), que afecta al 85% de los tumores. El gen BCL2 se reorganiza con los genes de la IgH (entre la región J y la región control) del cromosoma 14. El gen BCL2 codifica para una proteína de la membrana interna de la mitocondria. La alteración de BCL2 produce una vida prolongada de las células B. Esta alteración de BCL2 se encuentra en todo tipo de linfomas foliculares y en lesiones premalignas, como en la hiperplasia benigna de glándulas linfáticas o amígdalas. De este modo, la alteración BCL2/IgH produce un efecto similar al de la inmortalización de linfocitos B por parte del virus de Epstein-Barr, mediante la activación de BCL2. Experimentos en ratones transgénicos han demostrado que la alteración BCL2/IgH no es suficiente para desarrollar un tumor, sino que se requieren también otras mutaciones en la misma proliferación clonal.

Los linfomas foliculares con duplicación del brazo corto del cromosoma 7 (7p) o del brazo largo del cromosoma 12 (12q) cursan con un cuadro clínico más agresivo y grave.



**Fig. 9.71.** Mecanismos moleculares de las translocaciones t(8;22) y t(2;8) en el linfoma de Burkitt.

La translocación t(14,18) (implicando al gen BCL2) puede asociarse a una translocación t(8,14) (implicando al gen MYC), originando un linfoma folicular con un curso muy agresivo. Por otra parte, la asociación de otras alteraciones, como mutaciones en el gen supresor P53, del gen del retinoblastoma (RB1) o de genes implicados en la regulación de la transcripción, origina un linfoma difuso de mayor malignidad.

## Leucemia mieloide crónica y BCR/ABL

La LMC es el resultado de la transformación neoplásica monoclonal de una célula pluripotente de la hemopoiesis. En el 90% de los casos se demuestra la presencia de un cromosoma 22 anómalo, denominado cromosoma Filadelfia, el cual es el resultado de la translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22. En esta translocación el protooncogén ABL del cromosoma 9 se fusiona con una secuencia del cromosoma 22 que se conoce como BCR (del inglés, *breakpoint cluster union*), la cual codifica para la proteína denominada BCR, que tiene elevada actividad tirosinasa (fig. 9.72).

En el cromosoma Filadelfia los genes BCR y ABL se fusionan en la misma orientación 5' → 3', dando lugar a un gen híbrido BCR/ABL. El mRNA que se produce del nuevo gen mide 8,7 kb o 7,0 kb y codifica para una proteína de 210 kD o 190 kD. La proteína de fusión de 210 kD se encuentra en todos los casos de LMC, independientemente de si son cromosomas Filadelfia positivos o negativos. La proteína de 190 kD se encuentra en los casos de leucemia linfoblástica aguda (LLA) con cromosoma Filadelfia. En ambos casos el punto de rotura en el protooncogén ABL se produce en el interior del primer intrón, el cual mide unas 200 kb. En el BCR la translocación ocurre entre los exones 9 y 14, en el caso de la LMC, y en el primer intrón en la LLA (fig. 9.72).

El análisis de los mRNA que se producen en estos procesos permite determinar el tipo de patología molecular, constituyendo un factor pronóstico de gran importancia. Del mismo modo, la detección de la lesión molecular permite determinar la persistencia de la población neoplásica tras el tratamiento. En este tipo de análisis reviste gran importancia la utilización de la PCR, la cual permite detectar la secuencia de interés a partir de escaso material genético.

## Alteraciones cromosómicas y tumores sólidos

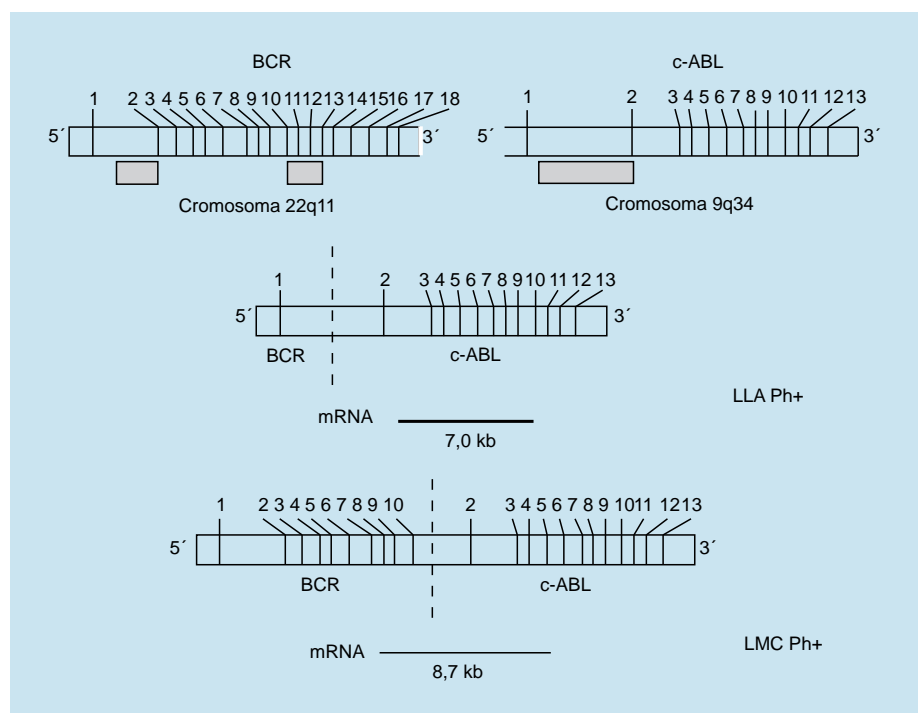
Se han referido en la literatura más de 15.000 casos con alteraciones cromosómicas en neoplasias, de los cuales más de 10.000 corresponden a hemopatías malignas. Ello se debe a las dificultades en los estudios cromosómicos de tumores sólidos. La tecnología de clonación molecular ha permitido la caracterización de las regiones implicadas en las anomalías citogenéticas de los tumores hematológicos. Sin embargo, en los últimos años, la tecnología de la clonación posicional ha permitido también el estudio de las translocaciones detectadas en algunos tumores sólidos.

Entre los tumores sólidos en los que ha sido posible caracterizar alteraciones cromosómicas merece destacar el sarcoma de Ewing y el neuroepitelioma periférico, con translocación t(11;22), debida a la fusión de los genes EWS (cromosoma 22) y Hum-FLI-1 (cromosoma 11). En la [tabla 9.20](#) se relacionan algunas de las alteraciones cromosómicas recurrentes detectadas en tumores sólidos humanos.

## Cáncer familiar dominante

Las formas hereditarias constituyen una pequeña porción del total de las neoplasias más frecuentes en el hombre (aproximadamente el 5-10%) y tienen una gran relevancia, al señalar la localización de genes que con frecuencia también están implicados en cáncer no familiar. En general, la herencia de una alteración genética no es suficiente para el desarrollo de una neoplasia, sino que se requieren otros cambios somáticos en el genoma.

La teoría de las dos lesiones descrita en el retinoblastoma (KNUDSON) constituye el principal mecanismo de las formas hereditarias de cáncer y del desarrollo tumoral en la mayoría de las neoplasias humanas. La primera lesión de un tumor sería una mutación en un gen implicado en el cáncer: en el caso de un cáncer hereditario sería en la línea germinal, y en los casos no familiares sería en una célula somática. La segunda lesión sería una mutación somática o la pérdida de la segunda copia (normal) del gen afecto. Así, la susceptibilidad neoplásica se transmite de forma dominante, mientras



**Fig. 9.72.** Patología molecular del cromosoma Filadelfia en la génesis de la leucemia mieloide crónica (LMC) y la leucemia linfoblástica aguda (LLA) cromosoma Filadelfia positivas (Ph+). El gen BCR se fusiona con el oncogén ABL. En el oncogén ABL la fragmentación se produce en una región de unas 200 kb entre los exones 1 y 2, mientras que en el gen BCR ésta puede producirse entre los exones 1 y 2 (LLA) o entre los exones 10 y 13 (LMC).

**TABLA 9.20.** Anomalías cromosómicas recurrentes en tumores sólidos

Enfermedad	Anomalía cromosómica
<i>Tumores epiteliales</i>	
Cáncer de vejiga urinaria	Alteraciones estructurales 1, 3, 11 i(5p)/5q-, +7, -9/9q-
Cáncer de mama	Alteraciones estructurales 1, 7 t/del(16q)
Cáncer de colon	Alteraciones estructurales 1, 17, 18 del(5q), del(6q)
Cáncer renal	t(5;14)(q13;q22)
Cáncer de ovario	Alteraciones estructurales 1, 7, 11 t/del(6q), t(6;14)(q21;q24)
Cáncer de próstata	del(7)(q22), del(10)(q24)
Cáncer de pulmón de células pequeñas	del(3)(p14p23)
Tumor de Wilms	t/del(11)(p13)
<i>Tumores mesenquimales</i>	
Rabdomiosarcoma alveolar	t(1;13)(q37;q14)
Liposarcoma mixoide	t(12;16)(q13;p11)
Condrosarcoma	t(9;22)(q31;q25)
Sarcoma de Ewing	t(11;22)(q24;q12)
Sarcoma sinovial	t(X;18)(p11;q11)
Lipoma	t(12)(q13-14)
Leiomioma	t(12;14)(q14-15;q23-24), del(7q)
<i>Tumores neurogénicos</i>	
Gliomas	Dobles diminutos, +7, -10
Neuroblastomas	Dobles diminutos, del(1)(p31-32)
Retinoblastoma	i(6p)
Meningiomas	-22/22q-
<i>Tumores melanocíticos</i>	
Melanoma maligno	t/del(6q), t(1;19)(q12;p13), t/del 9p
<i>Tumores germinales</i>	
Teratoma testicular/seminoma	i(12p)

**TABLA 9.21.** Principales genes implicados en el cáncer familiar

Proceso patológico	Gen	Localización cromosómica
<i>Genes aislados</i>		
Retinoblastoma	RB1	13q14
Tumor de Wilms	WT1	11p13
Síndrome de Li-Fraumeni	P53	17p13
Poliposis adenomatosa familiar	APC	5q21
Neurofibromatosis tipo 1	NF1	17q11
Neurofibromatosis tipo 2	NF2	22q12
Síndrome de Von Hippel-Lindau	VHL	3p25
Neoplasia endocrina múltiple tipo 2A	MEN2A	10q11
Síndrome de cáncer familiar de Lynch	MSH2	2p22-21
Cáncer de mama familiar	BRCA1	17q21
Esclerosis tuberosa 4	TSC4	16p13
<i>Genes localizados</i>		
Neoplasia endocrina múltiple tipo 1	MEN1	11q13
Melanoma familiar	MLM	9p21
Neuroblastoma	NB	1p36
Síndrome nevo basocelular	BCNS	9q31
Síndrome de Beckwith-Wiedemann	BWS	11p15
Carcinoma de células renales	RCC	3p14
Esclerosis tuberosa 1	TSC1	9q34

neoplásica (ello puede producirse como consecuencia de una mutación en cada alelo o de una sola mutación y la deleción del otro alelo). La baja penetrancia constituye la principal dificultad para su detección, pero en ciertos casos es posible que no existan lesiones en la línea germinal. La detección de mutaciones en los genes supresores permite la identificación de individuos con mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer. Esta posibilidad no se limita a las familias con cáncer hereditario, sino que las mutaciones pueden detectarse en individuos de la población general.

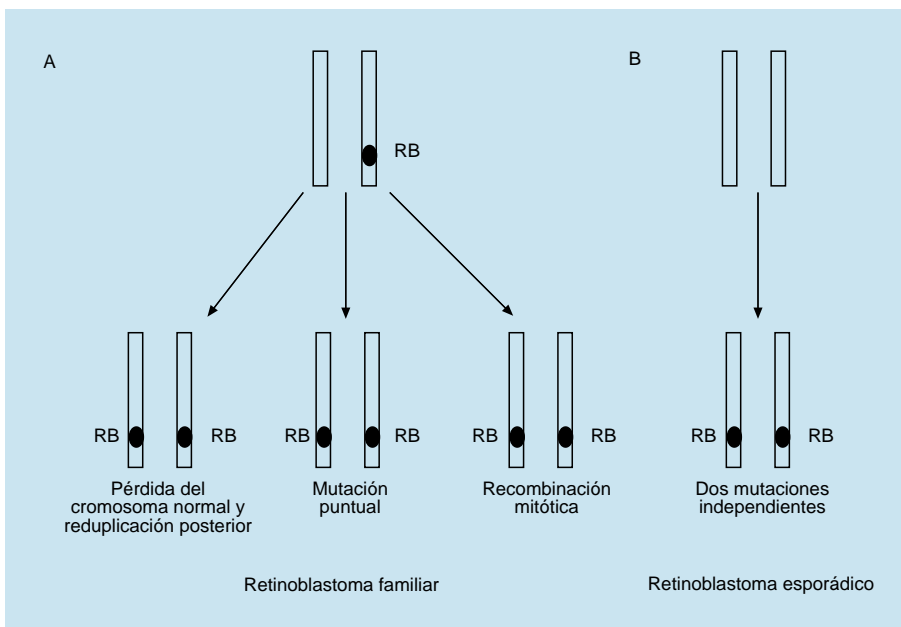
### Retinoblastoma: gen supresor de tumores

El inicio temprano de los tumores infantiles sugiere que para su desarrollo es necesario un número menor de cambios genéticos que en tumores de la edad adulta. El retinoblastoma (tumor ocular) y el tumor de Wilms (nefroblastoma) constituyen las neoplasias infantiles sobre las que se ha investigado con mayor profusión.

El retinoblastoma, un tumor de las células embrionarias

que la génesis neoplásica se produce de forma recesiva, siendo necesarias dos mutaciones en el mismo gen. La denominación de gen supresor del cáncer proviene del hecho que una copia normal del gen previene el cáncer.

En los últimos años se han aislado o identificado varios genes implicados en el cáncer familiar (tabla 9.21). La mayoría de estos genes son del tipo supresor de tumores, siendo necesaria la ausencia de un gen normal para la transformación



**Fig. 9.73.** Mecanismo de producción del retinoblastoma familiar (A) o esporádico (B). En el retinoblastoma familiar existe una mutación heredada en uno de los genes, produciéndose una segunda mutación, la pérdida y duplicación posterior del cromosoma mutado, o la recombinación mitótica; todos estos mecanismos conducen a dos genes mutados. En los casos esporádicos deben producirse de forma independiente dos mutaciones. RB: genes del retinoblastoma.



del ojo, es poco frecuente (afecta 1/20.000 niños) y generalmente esporádico, aunque existen casos con transmisión autosómica dominante. En la mayoría de casos se ha podido detectar una delección en la región q14 del cromosoma 13. En los casos familiares se observó que las delecciones afectaban la totalidad de las células del organismo, mientras que en los casos esporádicos las delecciones se hallaban confinadas a las células tumorales. Estas observaciones llevaron a la conclusión de que en el cromosoma 13 debía existir un gen implicado en el desarrollo del retinoblastoma, al que se denominó gen RB1. Sin embargo, la lesión de uno solo de los genes RB1 no explicaría el desarrollo del tumor, por lo que se sospechó la presencia de dos mutaciones, una inicial constitucional que afectaría a la totalidad de las células del individuo, y otra somática que afectaría sólo las células tumorales de la retina. Ello explicaría las dos formas de retinoblastoma. Los casos esporádicos, con tumor unilateral, se deben a dos mutaciones somáticas consecutivas que han afectado a los dos alelos. Los casos hereditarios se deben a una primera mutación constitucional, que determina una predisposición familiar para la descendencia, desarrollándose la neoplasia cuando se produce una segunda mutación somática (fig. 9.73).

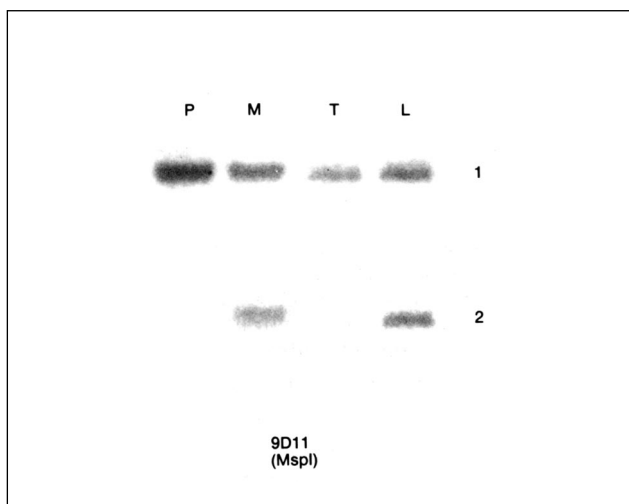
La demostración de la realidad de los genes supresores de tumores en el retinoblastoma fue posible gracias al análisis de la pérdida de heterocigosidad para marcadores polimórficos situados en la región 13q14. En las células constitucionales se observan los dos alelos, mientras que en el DNA tumoral se aprecia la ausencia de uno de los alelos (fig. 9.74). La identificación del gen RB1 se consiguió mediante clonación posicional, utilizando material de los pacientes en los que

el gen estaba delecionado. El gen RB1 cubre más de 180 kb y codifica para un mRNA de 4,7 kb, correspondiente a una proteína de 927 aminoácidos. Las sondas derivadas del gen RB1 permiten detectar delecciones en un tercio de los casos de retinoblastoma. Sin embargo, la mayoría de las lesiones en el gen RB1 se deben a mutaciones puntuales, y en un individuo dado las mutaciones en ambos cromosomas no son idénticas. En los pacientes con retinoblastoma hereditario puede desarrollarse también un osteosarcoma; ello se debe a la presencia de la misma mutación en las células que desarrollan ambos tumores, apareciendo una segunda mutación independiente en el otro alelo. El producto proteico del gen RB1 se localiza en el núcleo, actúa sobre el control del ciclo celular y se expresa en todas las células del organismo.

## Tumor de Wilms: neoplasia y anomalías del desarrollo

El tumor de Wilms (nefroblastoma) es una tumoración maligna derivada del blastema renal. La mayoría de los casos de tumor de Wilms son esporádicos y unilaterales, pero el 7% es bilateral y el 1% muestra recurrencia familiar. La mayoría de los pacientes con aniridia y tumor de Wilms presentan una alteración citogenética, consistente en la delección de la banda p13 del cromosoma 11. La delección p13 se asocia con frecuencia a alteraciones genitourinarias y retraso mental, designándose esta asociación WAGR. El 30-50% de los niños con la delección presentan criptorquidia bilateral e hipospadias.

Los estudios de clonación posicional permitieron la identificación del gen WT1, cuya secuencia codificante sugiere una proteína implicada en la regulación de la transcripción proteica. El gen WT1 podría actuar suprimiendo el crecimiento y la proliferación celulares al unirse y bloquear a los promotores de genes que favorecen el crecimiento. Se han descrito mutaciones puntuales o alteraciones que interrumpen el gen WT1, algunas en estado homocigoto, que demuestran que WT1 es un gen supresor de tumores. El patrón de expresión del gen WT1 es compatible con un papel en la diferenciación de la célula progenitora metanefrítica. Los casos de WAGR se deben a alteraciones en la región cromosómica implicada en el tumor de Wilms y anomalías genitourinarias, cubriendo unas 350 kb. Se han descrito casos de alteraciones genitourinarias con delecciones del gen WT1, pero su papel final en el desarrollo renal está todavía por determinar. En la región 11p13 se ha detectado un gen, PAX6 (AN1), que presenta mutaciones que producen una proteína truncada o anómala en los pacientes con aniridia. Con respecto al tumor de Wilms, parece claro que otros *loci* adicionales en la región 11p13 pueden desempeñar un papel en este tumor. De hecho, el 12% de los pacientes con síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW) que desarrollan un tumor también presentan un tumor de Wilms. La región cromosómica implicada en el SBW corresponde a 11p15, y los genes INS e IGF2 han sido propuestos como posibles responsables de esta enfermedad (tabla 9.22).



**Fig. 9.74.** Pérdida de heterocigosidad para un marcador (9D11) de la región 13q14 en un caso de osteosarcoma esporádico. Se observa que el DNA de las células tumorales ha perdido el alelo 2. En este caso el alelo perdido en el tumor es el alelo materno. P: padre; M: madre; T: tumor; L: linfocitos.

**TABLA 9.22.** Alteraciones preferenciales en alelos en el cáncer

Tumor	Cromosoma	Alteración	Gen	Origen del alelo alterado
Tumor de Wilms	11	LOH	?	Materno
Tumor de Wilms	11	LOI	IGF2, H19	Materno IGF2, paterno H19
Rabdomiosarcoma	11	LOH	?	Materno
Retinoblastoma bilateral	13	LOH	RB	Materno
Osteosarcoma esporádico	13	LOH	RB	Materno
Retinoblastoma unilateral	13	LOH	RB	Materno
LMA	7	LOH	?	Materno
LMC	9,22	Translocación	BCR/ABL	Materno BCR, paterno ABL
Neuroblastoma	1	LOH	?	Materno
Neuroblastoma	2	Amplificación	N-MYC	Paterno

LOH: pérdida de heterocigosidad; LOI: pérdida de *imprinting*; LMA: leucemia mieloide aguda; LMC: leucemia mieloide crónica.

## Neurofibromatosis 1: mutaciones en un gen supresor de tumores

La neurofibromatosis tipo 1 (enfermedad de VON RECKLINGHAUSEN) es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes, que afecta a unos 3 millones de individuos en el mundo. El gen NF1, localizado en el cromosoma 17q11 en 1987 y aislado en 1990, es un gen supresor de tumores. Los pacientes con NF1 tienen neurofibromas múltiples, cutáneos o plexiformes (tumores benignos formados por células de Schwann y fibroblastos), manchas café con leche (crecimiento anómalo de melanocitos) y nódulos de Lisch (hamartomas del iris), así como una elevada incidencia de neurofibrosarcomas malignos (derivados de neurofibromas benignos), feocromocitomas (derivados de médula suprarrenal) y gliomas ópticos (derivados de células gliales), además de anomalías óseas, retraso mental y dificultades para el aprendizaje. La gran variedad de células y órganos implicados en NF1 sugiere que el gen NF1 puede desempeñar un papel relevante en la regulación del crecimiento y desarrollo.

El 50% de los casos de NF1 son esporádicos, ya que no se encuentran lesiones de NF1 en ninguno de los progenitores. Estos casos esporádicos se deben a mutaciones *de novo*, la mayoría de las cuales se producen en los gametos paternos. Desde que se identificó el gen NF1 se ha realizado una búsqueda intensa de mutaciones en los pacientes con NF1. Hasta el momento, sólo el 10% de las mutaciones responsables de NF1 han sido identificadas.

La proteína de NF1, la neurofibromina, tiene homología con proteínas que regulan negativamente la actividad de GTPasas, como RAS p21. El papel de la neurofibromina en el cáncer se ha puesto de manifiesto por la presencia de mutaciones en tumores no relacionados con NF1 (tabla 9.23). En algunos melanomas y neuroblastomas, y en un neurofibrosarcoma, las mutaciones en el gen NF1 presentan un patrón de homocigosidad, lo cual sugiere que NF1 es un gen supresor de tumores. La detección de mutaciones en el gen NF1 en tumores distintos a los de la NF1 muestra similitud con el gen RB1 y mutaciones en otras neoplasias, como en el carcinoma de células pequeñas de pulmón.

## Neurofibromatosis tipo 2, schwannomas y meningiomas

La neurofibromatosis tipo 2 (NF2) es un trastorno poco frecuente que afecta a 1/40.000 individuos y se caracteriza por schwannomas bilaterales que se desarrollan en la rama vestibular del VIII par craneal. Otros tumores del SNC acompañan la enfermedad, especialmente meningiomas y schwannomas de otros nervios craneales y radiculares. La NF2 se transmite de forma autosómica dominante con una penetrancia del 95%, tratándose de un proceso mucho más grave que la NF1.

Los estudios de ligamiento genético localizaron el gen de la NF2 en el cromosoma 22 (22q21). La pérdida del gen NF2 tiene importancia para el desarrollo de meningiomas y schwannomas esporádicos. Los experimentos de clonación posicional han permitido la identificación del gen NF2. El gen identificado mide 1.785 bases y codifica para una proteína de

595 aminoácidos denominada schwannomina. El análisis de pacientes con NF2 y de sus tumores ha revelado distintas mutaciones que confirman que estas lesiones moleculares son responsables del fenotipo NF2. Se han detectado alteraciones en el cromosoma 22 en otros tumores, incluyendo carcinomas de colon y de mama.

## Poliposis adenomatosa familiar y cáncer colorrectal

Los tumores de colon han sido un modelo excelente para correlacionar los distintos estadios morfológicos de alteraciones en el colon con mutaciones en distintos genes implicados en la génesis tumoral. En el desarrollo de tumores colorrectales participan mutaciones en el gen supresor de tumores APC (poliposis adenomatosa colónica). Las mutaciones en el gen APC pueden ser somáticas o germinales. Las mutaciones somáticas originan un tumor colorrectal único, mientras que las germinales producen el desarrollo de miles de tumores en el colon. Estos tumores pueden sufrir mutaciones en otros genes, como RAS, DCC o P53, dando como resultado un carcinoma (fig. 9.64). El gen APC fue aislado en 1991 mediante clonación posicional, se localiza en el cromosoma 5q21-22 y codifica para una proteína de 2.843 aminoácidos. El gen APC actúa como un gen supresor de tumores en el aparato digestivo.

Además de la poliposis colorrectal, los pacientes con poliposis adenomatosa colónica familiar pueden presentar neoplasias en otros tejidos. El síndrome de Gardner consiste en poliposis colorrectal, osteomas, quistes epidermoides y tumores de tejidos blandos. El síndrome de Turcot cursa con poliposis colorrectal y tumores neuroepiteliales del SNC. En ambos síndromes se detectan mutaciones en la línea germinal. En pacientes con poliposis adenomatosa colónica o con síndrome de Gardner se han detectado las mismas mutaciones.

Se encuentran mutaciones germinales en los codones 1285 a 1465 principalmente en pacientes que desarrollan más de 5.000 pólipos de colon y recto, mientras que los pacientes con pocos pólipos tienen mutaciones en otras regiones del gen APC. El 98% de las mutaciones del gen APC detectadas en la línea germinal de los pacientes con poliposis adenomatosa colónica familiar, en los cánceres colorrectales que éstos desarrollan o en tumores esporádicos, se producen en la primera mitad de la región codificante. La distribución de las mutaciones germinales en la primera parte de la región codificante del gen APC es uniforme, mientras que el 66% de las mutaciones en el cáncer colorrectal se circunscriben a una región determinada, entre los codones 1286 y 1513, coincidente con la región con mutaciones asociadas a un fenotipo más grave.

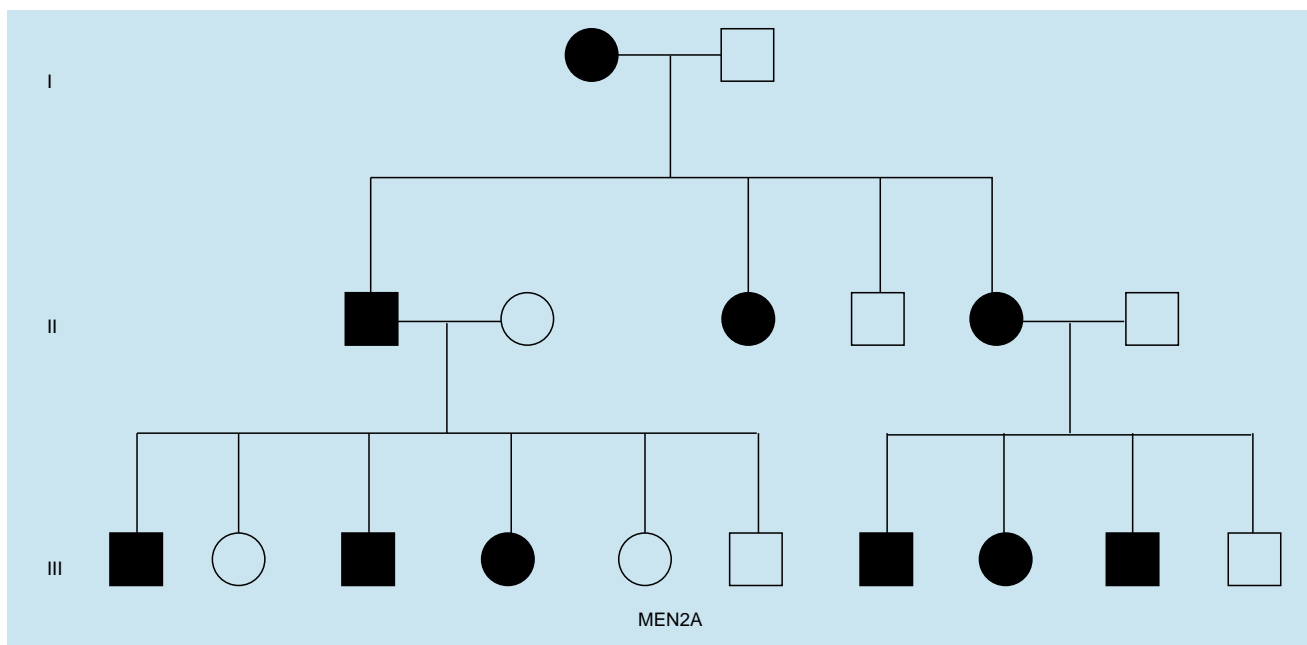
La identificación del gen APC permite el diagnóstico presintomático en miembros de familias afectas, con el objeto de determinar el estado de portador de mutaciones en el gen APC. De las mutaciones germinales que se han detectado, el 33% se encuentra en sólo tres codones (1061, 1309 y 1465), mientras que el resto está disperso en otros codones (mitad 5' del gen). De este modo, para el diagnóstico presintomático es necesario combinar métodos indirectos con marcadores altamente polimórficos, situados en el seno del gen APC, con el estudio de mutaciones.

## Neoplasia endocrina múltiple

La neoplasia endocrina múltiple (MEN) es un trastorno familiar que se caracteriza por hiperplasia de varios órganos derivados del tubo neural. La MEN se transmite de forma autosómica dominante en las familias afectadas, con una alta penetrancia (fig. 9.75). Existen dos formas bien conocidas de MEN: una afecta principalmente el tiroides (produciendo carcinoma medular de tiroides, TMC), las suprarrenales (feocromocitoma) y las paratiroides (hiperplasia), que se conoce

**TABLA 9.23.** Tumores asociados a alteraciones del gen NF1

Tumor	Asociado a NF1	Alteración
Neurofibrosarcoma	Sí	Deleciones
Feocromocitoma	Sí	Deleciones
Astrocitoma	Sí	Mutación <i>missense</i>
Melanoma maligno	No	Deleciones
Neuroblastoma	No	Deleciones
		Mutación <i>missense</i>
Cáncer de colon	No	Mutación <i>missense</i>
Síndrome mielodisplásico	No	Mutación <i>missense</i>



**Fig. 9.75.** Genealogía de una familia con miembros afectados de MEN2A. Los símbolos en negro indican el estado de afectación clínica.

como MEN2A; la otra produce hiperplasia o tumor y afecta sobre todo a la glándula pituitaria, el páncreas y las glándulas paratiroides y se conoce como MEN1. Los estudios de ligamiento genético han permitido localizar el gen responsable de MEN1 en el brazo largo del cromosoma 11 (11q13), mientras que el *locus* de MEN2A se encuentra en la región centromérica del cromosoma 10. El TMC se presenta también de forma familiar (TMCF) y el *locus* para el mismo se encuentra en el cromosoma 10. MEN2B tiene un fenotipo más complejo, con ganglioneuromas difusos del tubo digestivo y anomalías esqueléticas, además de TMC bilateral y feocromocitoma.

En los estudios de ligamiento genético para MEN2A se sospechó que el oncogén RET, un receptor de tipo tirosincinasa, podía tener un papel en la enfermedad. RET se expresa en tumores derivados de la cresta neural, en médula espinal y en células leucémicas. Se han identificado varias mutaciones en el oncogén RET en casos de TMCF y MEN2A, la mayoría en los exones 7 y 8. Curiosamente, las mutaciones detectadas se producen en codones codificantes para cisteínas, sugiriendo que los cambios provocan alteraciones importantes en la estructura secundaria y terciaria del producto de RET mutado. Los resultados obtenidos demuestran que el oncogén RET es responsable de, al menos, dos de las formas hereditarias de MEN2.

El oncogén RET no es un gen supresor de tumores, pero mutaciones en él dan lugar a predisposición neoplásica. Los estudios encaminados a dilucidar su patología molecular y su papel en la célula deberán aportar considerable información sobre su efecto en la predisposición al desarrollo tumoral. El gen RET se encuentra también mutado en los casos de enfermedad de Hirschsprung (megacolon con ausencia congénita de ganglios entéricos, que afecta a 1/5.000 individuos y se hereda de forma autosómica dominante), aunque en distintos dominios del gen RET.

## Síndromes de cáncer familiar recesivo

Entre los síndromes de cáncer familiar recesivo se encuentran la anemia de Fanconi, el xeroderma pigmentoso, la ata-

xia-telangiectasia y el síndrome de Bloom. En los últimos años se han realizado importantes progresos en la identificación de los genes implicados en su desarrollo, habiéndose localizado e identificado varios de los genes relacionados con la anemia de Fanconi y el xeroderma pigmentoso.

La anemia de Fanconi consiste en un cuadro clínico que incluye estatura corta, pulgares cortos o ausentes, cara triangular, dificultad de aprendizaje o retraso mental y pigmentación de la piel. Los pacientes desarrollan anemia con disminución de las cifras absolutas de leucocitos y plaquetas y tienen una elevada predisposición a padecer leucemia aguda no linfoblástica. Una de las principales características de la anemia de Fanconi es la fragilidad de los cromosomas en los linfocitos cultivados, los cuales se rompen con gran facilidad, que puede ser acentuada mediante la adición de medios químicos. Esta observación pone de manifiesto un defecto en la reparación del DNA, de forma que las lesiones normales que suceden en el material genético no pueden repararse convenientemente.

En el xeroderma pigmentoso se han definido localizaciones cromosómicas en 2q21, 19q13.2-13.3, 9q34.1 y en el cromosoma 15. Sin embargo, existen también otras localizaciones cromosómicas tentativas, lo que demuestra la elevada heterogeneidad de esta entidad.

La ataxia-telangiectasia se caracteriza por ataxia cerebelosa progresiva, infecciones recurrentes, telangiectasias, alteraciones cromosómicas, hipersensibilidad de los fibroblastos y linfocitos a las radiaciones ionizantes y riesgo elevado de neoplasia. Un *locus* para la ataxia-telangiectasia ha sido determinado en el cromosoma 11q22-23.

## Otros genes supresores y predisposición neoplásica

Además de los trastornos y genes descritos previamente en este capítulo, otros genes han sido descubiertos o relacionados con predisposición neoplásica. Recientemente se ha aislado del cromosoma 2 (2q13-24) un gen implicado en el cáncer de colon hereditario no polipoideo (HNPCC) y el carcinoma de endometrio (síndrome de Lynch 2). El producto de este gen está implicado en la reparación de errores del

DNA. Otro locus implicado en el HNPCC y el carcinoma de endometrio se ha localizado en el cromosoma 3p.

Otro gen supresor de tumores que ha sido descubierto es el de la enfermedad de Von Hippel-Lindau, un proceso que predispone a tumores oculares, cerebrales y renales. Por otra parte, se ha identificado el papel del gen P53 en el síndrome de Li-Fraumeni, entidad en la que se desarrolla cáncer familiar con una elevada incidencia de varios tipos de sarcomas. La lista de genes supresores aislados aún es poco extensa (tabla 9.21), pero probablemente seguirá creciendo, a medida que la observación clínica y los estudios genéticos permitan desvelar los factores hereditarios del cáncer.

El estudio de los distintos genes implicados en el cáncer proporcionará una mejor comprensión sobre los complejos mecanismos que conducen a la transformación neoplásica. Si somos capaces de comprender estos procesos, podremos desarrollar nuevas estrategias terapéuticas con fármacos que realicen funciones similares a las de los genes supresores normales o que interfieran en los efectos de los oncogenes mutados. Finalmente, el conocimiento de las bases moleculares del cáncer debería permitir la prevención adecuada en grupos de alto riesgo, así como en la población general.

### Bibliografía especial

- BISHOP JM. The molecular genetics of cancer. *Science* 1987; 235: 305-311.
- BOGUSKI MS, McKORMICK F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 1993; 366: 643-654.
- FEARON ER, VOGELSTEIN BA. Genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
- FISHEL R, LESCOE MK, RAO MRS, COPELAND NG, JENKINS NA, GARBER J et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75: 1.027-1.038.
- HARRIS C, HOLLSTEIN M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993; 329: 1.318-1.327.
- KNUDSON AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10.914-10.921.
- LEWIN B. Oncogenic conversion by regulatory changes in transcription factors. *Cell* 1991; 64: 303-312.
- ULLRICH A, SCHLESSINGER J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990; 61:203-212.
- YUNIS JJ, TANZER J. Molecular mechanisms of hematologic malignancy

## Genética y tratamiento

X. Estivill Pallejà

En la actualidad no existe un tratamiento adecuado para las enfermedades genéticas. En la mayoría de los casos la terapia de que disponemos va dirigida sólo a controlar la sintomatología del proceso. En algunas enfermedades, por ejemplo la hemofilia, es posible la administración del producto proteico deficitario. En la fenilcetonuria la eliminación del aminoácido fenilalanina en la dieta impide el desarrollo de lesiones orgánicas irreversibles. Sin embargo, la terapéutica sustitutiva o de acción sobre el producto bioquímico implicado en la enfermedad no es adecuada para procesos en los que hay un órgano diana específico para la acción de la proteína o enzima o existen mecanismos reguladores específicos, cuyo control escapa a las posibilidades farmacológicas disponibles en la actualidad.

Los avances en genética molecular están permitiendo el desarrollo de nueva tecnología para el tratamiento de las enfermedades, con el objeto de corregir los defectos genéticos responsables de las mismas. Los resultados de los experimentos en animales de laboratorio sugieren que el tratamiento génico será de gran utilidad para las enfermedades de la médula ósea, hepáticas, SNC, cáncer y déficit enzimáticos y de factores de la coagulación. La mayoría de los nuevos sistemas implican la transferencia de genes normales o modificados a las células específicas del paciente, consiguiendo expresar el gen normal y corregir el fenotipo enfermo.

### Terapia génica

Para la mayoría de las enfermedades hereditarias no existe un tratamiento efectivo, y la terapia actual se limita a disminuir o paliar la sintomatología de los pacientes. El tratamiento definitivo de una enfermedad genética sólo es posible mediante la corrección del defecto genético del gen mutado.

De un modo genérico, podemos considerar que los trasplantes de órganos son un tipo de terapia génica. En estos casos se ha podido demostrar la eficacia de la terapia génica

para procesos de base hereditaria: trasplante de médula ósea para las hemoglobinopatías graves o déficit inmunológicos congénitos, de hígado en enfermedades del metabolismo hepático, de riñón en la poliquistosis renal del adulto y pulmonar en la fibrosis quística. Los progresos en la eficacia de los trasplantes, la utilización de inmunodepresores y el control tecnológico del trasplante en sí han permitido contemplar una nueva perspectiva para la curación de las enfermedades hereditarias. Sin embargo, las dificultades en la obtención de órganos, las graves infecciones víricas de los pacientes trasplantados y la necesidad de tratamientos inmunodepresores prolongados justifican la búsqueda de sistemas terapéuticos alternativos.

La terapia génica consiste en la introducción en el organismo de un gen normal, el cual debe corregir la alteración genética del organismo receptor. La terapia génica se ha llevado a cabo con éxito en la *Drosophila* y en el ratón, y es de esperar que pueda emplearse eficazmente en el tratamiento de las enfermedades genéticas humanas, incluyendo el cáncer. La corrección de un defecto genético mediante genética molecular puede realizarse de dos formas: a) la *terapia génica* propiamente dicha, que incluye la reparación del genotipo alterado actuando directamente sobre el defecto molecular y b) la *corrección genética*, en la que se corrige el fenotipo alterado mediante la introducción de una versión normal del gen. Emplearemos el término terapia génica para referirnos a todo tipo de tratamiento que implique el empleo de tecnología molecular y celular para corregir el defecto genético.

En unos casos el objetivo es el autotrasplante de las propias células del paciente tras modificarlas genéticamente *in vitro*, mediante la introducción del gen normal en su interior. Otra posibilidad es la terapia génica *in vivo*, en la que se introduce directamente el gen normal en un tejido determinado del individuo.

Las células de los mamíferos contienen herramientas enzimáticas y estructurales para la recombinación específica del DNA foráneo, que permiten las modificaciones genéticas de cualquier secuencia conocida. En estos experimentos se busca la *recombinación homóloga* entre las secuencias que se



**TABLA 9.24.** Principales protocolos de terapia génica

Protocolo	Centro	Enfermedad	Inicio
NeoR/TIL	NIH/Bethesda	Melanoma maligno	1989
NeoR/TIL	Universidad de Pittsburgh	Melanoma maligno	1992
NeoR/TIL	Centro Leon Berard, Lyon	Melanoma maligno	1991
TNF/TIL	NIH/Bethesda	Melanoma maligno	1991
HLA-B7/melanoma	Universidad de Michigan Ann Arbor	Melanoma maligno	1993
NeoR/TIL	Universidad de California Los Ángeles	Melanoma maligno Cáncer renal	1993
NeoR/médula ósea	St. Jude Children's R. Hospital, Memphis	LMA	1991
NeoR/médula ósea	MD Anderson, Houston	LMC	1993
NeoR/médula ósea	Universidad de Indiana Indianápolis	LLA/LMA	1993
NeoR/médula ósea	St. Jude Children's R. Hospital, Memphis	Neuroblastoma	1992
TNF/células tumorales	NIH/Bethesda	Cáncer terminal	1992
IL-2/células tumorales	NIH/Bethesda	Cáncer terminal	1992
Herpes simple/timidincinasa	Universidad de Rochester	Cáncer de ovario	1993
Herpes simple/timidincinasa	Fred Hutchinson, Seattle	SIDA	1993
NeoR/hepatocitos	Baylor, Houston	Insuficiencia hepática	1993
Factor IX/fibroblastos	Universidad Fudan, Shanghai	Hemofilia B	1991
LDL-R/hepatocitos	Universidad de Michigan, Ann Arbor	Hipercolesterolemia familiar	1992
ADA/células T	NIH/Bethesda	Déficit ADA	1990
ADA/células T	Hospital St. Raffaele, Milán	Déficit ADA	1992
ADA/médula ósea	Universidad de Leiden	Déficit ADA	1993
CFTR/adenovirus	Universidad de Lyon	Fibrosis quística	1993
CFTR/adenovirus	Universidad de Iowa	Fibrosis quística	1993
CFTR/adenovirus	NIH/Bethesda	Fibrosis quística	1993
CFTR/adenovirus	Gene Therapy Center, Filadelfia	Fibrosis quística	1993
CFTR/liposomas	Universidad de Londres	Fibrosis quística	1993

ADA: adenosindesaminasa; CFTR: regulador transmembrana de la fibrosis quística; LDL-R: receptor de lipoproteínas de baja densidad; LLA: leucemia linfoblástica aguda; LMA: leucemia mieloide aguda; LMC: leucemia mieloide crónica; NeoR: gen de resistencia a la neomicina; TIL: linfocitos infiltrantes de tumor.

transfieren y la secuencia diana que se quiere modificar. Por otra parte, se han realizado experimentos que permiten la *modificación de la expresión* de determinados genes mediante la introducción en las células de sus secuencias normales. Uno de los efectos no deseados de la introducción de un gen exógeno es la posibilidad de que éste se sitúe en un lugar no habitual del genoma y que pueda alterar la expresión de otros genes.

En la *Drosophila* se ha conseguido corregir varios defectos genéticos transfiriendo los genes implicados a los embriones mediante *transposones*. En los vertebrados, los mayores éxitos en terapia génica se han obtenido mediante la utilización de vectores retrovíricos, con los que se ha conseguido transferir genes funcionales a las células de la médula ósea. El primer éxito en terapia génica en vertebrados se consiguió en una cepa de ratón denominada *little*, el cual tiene una mutación que origina concentraciones séricas bajas de hormona

del crecimiento. La transferencia del gen normal de la hormona del crecimiento a estos ratones da como resultado altos niveles de expresión del gen, corrigiéndose el defecto, aunque de forma incontrolada, por lo que el tamaño de los ratones obtenidos es superior al de los normales.

La terapia génica en seres humanos ha progresado de forma espectacular en poco tiempo. A finales de 1990 se inició la primera experiencia en seres humanos de terapia génica para corregir la deficiencia de adenosindesaminasa (ADA). En la actualidad existen más de dos docenas de protocolos clínicos de terapia génica en el mundo (tabla 9.24). El éxito de la aplicación clínica de la terapia génica dependerá de la coordinación en el desarrollo de las distintas tecnologías y de la interacción entre los investigadores clínicos y básicos. En la actualidad la investigación que se realiza se centra en: a) el desarrollo de métodos de transferencia de genes, y b) el desarrollo de modelos clínicos de terapia génica.

### Métodos para la transferencia de genes

El desarrollo de métodos para transferir genes es una de las principales áreas de investigación. Existen dos grandes vías para transferir genes a las células de mamíferos; a) el empleo de vectores víricos (retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus herpes, virus de la poliomielitis u otros virus RNA) y b) los métodos químicos (precipitación del DNA mediante fosfato cálcico, encapsulación del DNA en liposomas, exposición de las células a cambios rápidos de voltaje –electroporación– o conjugados que ligan DNA). Los distintos métodos empleados para transferir genes y su eficacia y modo de aplicación (*ex vivo* o *in vivo*) se resumen en la **tabla 9.25**. En el caso de los retrovirus y los virus adenoasociados las secuencias de DNA se integran de forma estable en el material genético de la célula diana. Estos vectores se han empleado principalmente para experimentos *ex vivo*, lo cual supone aislar las células diana del organismo, transferir el material genético *in vitro* y reintroducir las células modificadas en el organismo. Los otros métodos, que se emplean principalmente *in vivo*, no implican la integración del material genético en el núcleo de las células diana y tienen como resultado una expresión alta, pero transitoria, del gen transferido. Tanto *in vivo* como *in vitro* el gen que se va a transferir puede ser el cDNA o la secuencia genómica de un gen. En algunos casos la secuencia genómica comprende varios cientos de kilobases (kb), con lo que la transfección de genes de un tamaño tal es altamente difícil.

La mayoría de los experimentos de transferencia de genes realizados se han centrado en la complementación de los

**TABLA 9.25.** Métodos para la transferencia de genes en las células de mamíferos para terapia génica

Método	Aplicación en terapia génica		Estabilidad
	Ex vivo	In vivo	
<i>Vírico</i>			
Retrovirus	+	?	E
Adenovirus	+/-	+	T
AAV	+	?	E
Herpes virus	+/-	+	?
Poliovirus	+/-	+	T
Otros virus RNA	+/-	+	T
<i>No vírico</i>			
Complejos DNA	-	+	T
Complejos DNA/adenovirus	-	+	T
Liposomas	+/-	+	T
Microyección	-	+	T
Precipitación fosfato	+/-	-	E

+; principal aplicación; +/-: alguna aplicación; -: sin aplicación; E: expresión estable; T: expresión transitoria; AAV: virus adenoasociado.



defectos genéticos *in vitro* y la implantación de las células modificadas en el organismo vivo. El órgano diana de implantación debe ser el que exprese la enfermedad, el cual debe ser fácilmente accesible, poder manipularse *in vitro*, ser modificable y contener células madre pluripotentes que permitan la perpetuación de la corrección genética. Además, debe ser posible la reimplantación de las células modificadas en el organismo de forma estable y funcional. La médula ósea cumple la mayoría de los criterios mencionados anteriormente, y ha sido uno de los órganos en los que se han realizado más experimentos de terapia génica.

## Virus

Uno de los sistemas más eficaces de transferir genes es mediante la utilización de vectores víricos, capaces de infectar prácticamente cada célula de la población celular que se somete a transfección. Existen grandes ventajas en la utilización de vectores víricos. En primer lugar, la eficacia de la transfección puede ser del 100% de las células. En segundo lugar, pueden infectarse de forma simultánea tantas células como se desee. En tercer término, en las condiciones adecuadas sólo una secuencia se integrará en un lugar único del genoma, mientras que con los métodos físicos y químicos se introducen copias múltiples. En cuarto lugar, la estructura del genoma vírico que transporta la secuencia que se ha de integrar es conocida. En quinto término, la infección y la manipulación de las células no es un mecanismo tan lesivo para ellas, como sucede con los otros métodos. Finalmente, los distintos pasos son muy controlables y se ha desarrollado una amplia experiencia.

Existen, sin embargo, ciertas dificultades en el empleo de virus, derivadas del hecho que el vector vírico puede lesionar seriamente las células huésped mediante la inserción del virus en una región esencial del genoma, la activación de un oncogén, la activación de un virus lento o latente o la transformación del virus vector en un virus patológico infeccioso, al recombinarse con secuencias celulares. Así pues, es necesario emplear virus que se integren en las células huésped sin lesionar su genoma y que expresen los genes introducidos de forma estable y eficaz.

### Retrovirus

Los retrovirus parecen ser los vectores más útiles para la mayoría de los experimentos de terapia génica al ser capaces de infectar una amplia gama de tipos celulares. Sin embargo, los retrovirus precisan que las células se repliquen para que la forma de provirus (DNA) pueda integrarse en el genoma, con lo que su empleo se restringe a las células que pueden dividirse. Una de las grandes ventajas del empleo de retrovirus es la estabilidad funcional y estructural de las formas integradas del vector retrovírico o provirus. A pesar de que los retrovirus pueden integrarse en cualquier parte del genoma, parecen existir ciertos lugares de inserción preferenciales.

Cuando los retrovirus infectan a una célula el material genético del virus se retrotranscribe de RNA a DNA de doble hebra. Este DNA puede integrarse de forma precisa como copia simple, denominada *provirus* en el genoma de la célula huésped. Los vectores para la transfección de genes derivan de modificaciones de algunos de los retrovirus como el virus murino de Moloney (Mo-MLV). El vector conserva las secuencias LTR indispensables para el control de la transcripción y de la integración, la secuencia necesaria para la encapsulación, y la secuencia PB necesaria para la replicación vírica. Los genes víricos *gag*, *pol* y *env* han sido delecionados y reemplazados por el gen a transferir, el cual puede acompañarse del propio promotor del gen o de otro distinto, a la vez que de un marcador selectivo. Otro virus, denominado *helper*, es portador de los genes retrovíricos completos necesarios para la multiplicación del genoma vírico y la formación de partículas víricas completas, aunque le faltan las secuencias LTR, PB y  $\psi$ , aportadas por el vector. La forma

provírica del *helper* se encuentra integrada en el genoma de una línea celular de ratón. Tras la transfección con el virus defectivo la cepa celular es capaz de producir partículas víricas infectivas. Las células de ratón producirán sólo los virus defectivos, portadores del gen que se ha de transfectar, y la misión de ellas es la producción de grandes cantidades del virus a transfectar. De este modo, cuando se realice la transferencia de estos virus en las células diana, al no poseer éstas el virus *helper*, no podrán multiplicarse, limitándose a la integración en el genoma de la célula a modificar (fig. 9.76).

Los retrovirus permiten la transferencia del material genético en prácticamente la totalidad de las células diana. Es un método ideal para aplicaciones *ex vivo*. Las principales limitaciones actuales son: a) el escaso conocimiento que se tiene sobre los receptores celulares para los distintos retrovirus en cada tipo celular; b) la necesidad de integración en el genoma de la célula diana, la cual es dependiente de su capacidad de división en los períodos iniciales tras la transfección, y c) la escasa estabilidad de los retrovirus. En los últimos años se han producido células que generan virus que no pueden replicarse en otras células, con lo que se ha eliminado su poder infeccioso. Sin embargo, en algunos animales de experimentación, en los que se emplearon virus portadores del material genético exógeno contaminados por virus con capacidad infectiva, se ha observado que varios de los animales desarrollaron linfomas.

### Adenovirus

Los adenovirus tienen posibles aplicaciones para terapia génica *in vivo*. Los adenovirus pueden infectar de forma eficaz células que no están en fase de división y facilitar la expresión de grandes cantidades del producto proteico. Los adenovirus son altamente estables sin producir en general la integración en el material genético de la célula diana. La eliminación de varios de los genes del adenovirus (E1A-E1B y E3) permite insertar segmentos exógenos de unas 7 kb. La capacidad del adenovirus para replicar *in vivo* puede depender del tipo de célula diana. Existen problemas de toxicidad para la célula por parte de algunos de los productos proteicos del adenovirus. Finalmente, la expresión de productos víricos en el curso de la expresión del material genético exógeno puede favorecer una respuesta inmune contra las células diana.

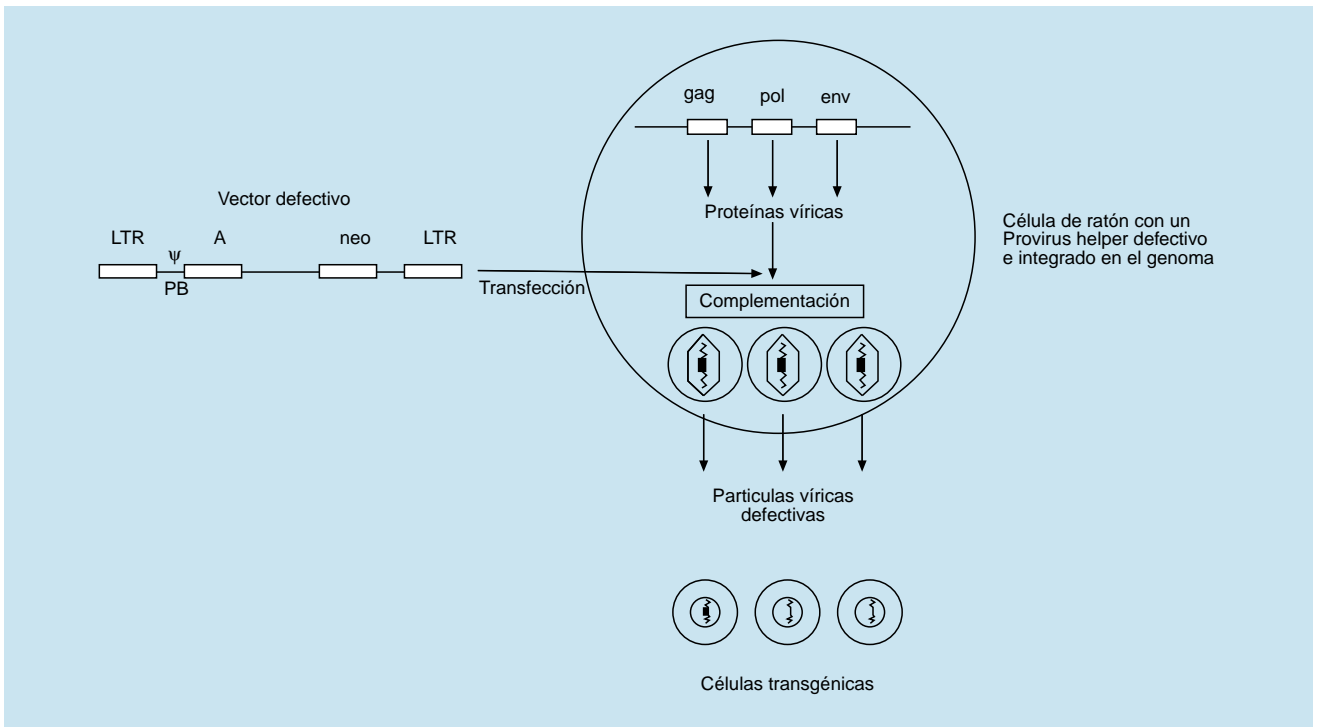
### Otros virus

Otros vectores víricos para terapia génica incluyen los *virus adenoasociados* (AAV), herpes, poliovirus y otros virus RNA. Los AAV pueden infectar células humanas, son muy estables y producen integración en el genoma de la célula diana. Los AAV se integran en el cromosoma 19, en una región que podría estar implicada en leucemias tipo B. Al parecer, los AAV no requieren que las células diana se encuentren en división.

Los *virus herpes* podrían tener importantes aplicaciones en trastornos que interesan el SNC. Sin embargo, todavía no se han dilucidado los efectos tóxicos para las células de los distintos productos de los virus herpes. Otros virus, que incluyen el de la poliomielitis y varios *virus RNA*, se encuentran en consideración y estudio.

## Métodos no víricos

La mayoría de los métodos no víricos que se están empleando en terapia génica se basan en sistemas normales que tienen las células para incorporar macromoléculas. Existe un gran interés en la endocitosis mediada por receptores, mediante la cual se generan complejos entre el DNA de plásmidos y ligandos polipeptídicos que pueden ser reconocidos por receptores en la superficie celular. El principal problema empleando este sistema es la posterior degradación del material incorporado a la célula. La incorporación de adenovirus al complejo permite mejorar la transferencia del material



**Fig. 9.76.** Empleo de retrovirus en terapia génica. El vector defectivo es portador del gen normal que se va a trasplantar (A) y de un marcador selectivo (neo), además de las secuencias necesarias para la transcripción, la encapsulación y la replicación víricas. La infección de células de ratón que tienen integrado, en forma de provirus, el resto de genes víricos permite la complementación y la producción del virus completo en el interior de dichas células. Los virus producidos se podrán integrar en el genoma, pero no podrán multiplicarse en la célula huésped infectada. LTR: long terminal repeat; PB: secuencia necesaria para la replicación vírica.

genético en las células diana, aunque la expresión de los genes es sólo temporal.

Otros métodos para transferir genes incluyen la electroporación y la microinyección. La electroporación recurre a cambios en el voltaje para permitir el paso del material genético a través de la membrana celular. A pesar de que se ha empleado con éxito en algunos casos, su aplicación a la terapia génica, frente a otros métodos existentes, es algo incierta. La microinyección se emplea desde hace años y es altamente eficaz (alrededor del 20% de las células inyectadas consiguen mantener el material genético introducido). Sin embargo, sólo una célula puede ser inyectada cada vez, con lo que la manipulación de un considerable número de células constituye una labor ardua.

La transferencia mediante métodos químicos se basa en la precipitación del material genético mediante fosfato cálcico. Este método es poco eficaz con células de médula ósea y tiene poco futuro en experimentos de terapia génica. Con los métodos físicos o químicos se introducen en el genoma varias copias del gen en cuestión situadas en tándem. Sin embargo, existen serias dificultades en la utilización de los métodos físicos o químicos de transferencia de genes. En primer lugar, la eficacia de la transferencia es muy baja (próxima al 1%), y, en segundo lugar, no existe control sobre el lugar en el que se integrará el DNA transferido, pudiendo hacerlo en cualquier sitio del genoma y originar el desarrollo de cuadros patológicos. A pesar de que la microinyección ha tenido un éxito espectacular en la obtención de animales transgénicos, esta técnica tiene difícil aplicación en seres humanos con fines terapéuticos, por lo que las otras técnicas alternativas suponen una mayor eficacia y garantía para la aplicación en seres humanos.

## Modelos clínicos de terapia génica

Para poder aplicar terapia génica en las distintas enfermedades genéticas es necesario trabajar en cada modelo pato-

lógico concreto. El estudio específico de cada problema requiere salvar dificultades técnicas específicas. Los avances logrados se han producido en grupos patológicos concretos.

La terapia génica debería ser ideal para reemplazar una enzima o proteína que falta en el interior de una célula o una proteína defectuosa en el torrente circulatorio. Algunos genes se encuentran funcionando de modo permanente, como es el caso del que codifica para la hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa, cuyo déficit produce la enfermedad de Lesch-Nyhan; el déficit de purina-nucleósido-fosforilasa, que provoca una inmunodeficiencia muy grave, y el déficit de ADA, que causa una inmunodeficiencia combinada letal. La extrema gravedad de estos tres síndromes, la localización del defecto en las células de la médula ósea y la ausencia de tratamientos eficaces sugieren que estos procesos podrán beneficiarse de la terapia génica. En los tres casos, disponemos de las secuencias de DNA que codifican para las proteínas respectivas.

## Trastornos hematológicos

Un grupo de enfermedades hereditarias en las que se creyó que sería posible la terapia génica fueron las hemoglobinopatías, especialmente debido a que son alteraciones de las células sanguíneas, que permiten manipular la médula ósea *in vitro* con cierta facilidad. Los principales problemas en la terapia génica de las hemoglobinopatías estriban en la extrema complejidad de los mecanismos que regulan la expresión de los genes de la  $\alpha$ -globina y la  $\beta$ -globina y el equilibrio entre ellas. Los experimentos iniciales que se han realizado en estas enfermedades no han tenido mucho éxito. Sin embargo, los experimentos en ratones transgénicos corrigiendo la talasemia en estos animales, con vectores que contienen las secuencias reguladoras del gen de la  $\beta$ -globina, sugieren que es posible obtener una expresión y una regulación génica eficaces.

Las células hematológicas ideales para ser modificadas son las células progenitoras. Una de las principales dificulta-

des estriba en obtener suficiente cantidad de células progenitoras para poder ser tratadas *ex vivo*. A esta dificultad se añade la ausencia de métodos adecuados para cuantificar los precursores hemopoyéticos. El tratamiento previo de las células con 5-fluorouracilo e interleucina 3, durante la adición del virus que debe infectarlas, facilita la integración del virus en el genoma de las células diana. Otro aspecto importante es la regulación de la expresión de los genes *transducidos*. En el caso de los genes de la  $\beta$ -globina, los niveles de expresión son muy bajos, debido a la ausencia de factores reguladores de la transcripción (especialmente los factores *lcr*) que se encuentran a varias kilobases del gen. A pesar de conocer desde hace años una parte considerable de la biología celular del sistema hematopoyético, esta información es todavía muy limitada en lo que concierne a la biología de las células progenitoras hematopoyéticas y del trasplante de médula ósea.

Mientras que la terapia génica de los trastornos de los genes de la hemoglobina es difícil debido a la compleja regulación de la expresión de estos genes, los esfuerzos en terapia génica se han centrado en el déficit de ADA. Éste se ha tratado durante años mediante trasplante de médula ósea. En 1990 se realizó el primer experimento de terapia génica para el déficit de ADA en una niña de 4 años que recibió sus propios linfocitos T corregidos. El protocolo que se siguió consistía en obtener linfocitos de la paciente, estimular la división de las células T, incubarlas con un retrovirus que llevaba el gen de la ADA normal y un gen de resistencia a la neomicina (NeoR), para posteriormente ser perfundidas a la paciente. Alrededor del 25% de las células T periféricas pudieron corregirse mediante este protocolo, realizándose tratamientos de mantenimiento cada 5 meses. Otros pacientes han sido tratados posteriormente con un éxito similar. Sin embargo, el tratamiento recibido no es definitivo y algunas de las pruebas inmunológicas no se han corregido. Una posibilidad es realizar la terapia génica sobre células progenitoras (la población CD34), además de hacerlo sobre las células T maduras. Si se consigue transducir las células progenitoras el efecto corrector puede ser permanente. En varios países se están desarrollando protocolos para tratar genéticamente el déficit de ADA, constituyendo el primer defecto genético abordado por terapia génica y, quizás, el primero en el que se obtenga un éxito definitivo.

### Trastornos hepáticos

Para los trastornos en los que están implicados genes de expresión hepática se han probado métodos *in vivo* y *ex vivo*. La mayoría de los experimentos se han realizado tratando las células hepáticas *ex vivo* e introduciendo las células modificadas en el hígado o el bazo. El principal problema estriba en la escasa implantación de las células trasplantadas, que es inferior al 10%. Se han realizado tres experimentos de terapia génica en el déficit del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-R), implicado en la hipercolesterolemia familiar. El tratamiento *ex vivo* de células hepáticas del propio paciente, obtenidas tras hepatectomía parcial, con retrovirus con el gen normal, resulta en la reimplantación del 10% de ellas en el hígado, con una producción de LDL-R suficiente para normalizar los niveles de colesterol, LDL, etc., incluso años después del tratamiento. Se ha observado también que los adenovirus pueden infectar el hígado de forma eficaz. El hígado desempeña un importante papel en el metabolismo humano y en la expresión de muchas enfermedades genéticas. Se han realizado investigaciones con hepatocitos de rata sobre la expresión de los genes que codifican para las LDL, la fenilalanina-hidroxilasa y la  $\alpha_1$ -antitripsina. Los experimentos realizados son muy prometedores, aunque el principal problema estriba en la reintroducción de las células modificadas en el hígado. El desarrollo de vectores capaces de actuar *in vivo* (quizá con tropismo hepático) podría ser el sistema ideal para la corrección de estos defectos. Muchas afecciones metabólicas podrían ser abordadas mediante terapia génica sobre células hepáticas. El desarrollo de

vectores adecuados y el incremento en la eficacia de implantación son los principales objetivos a cubrir.

### Trastornos respiratorios

La terapia génica de las enfermedades respiratorias se ha focalizado en el empleo de métodos que introduzcan el gen normal *in vivo*. El principal vector utilizado ha sido el adenovirus, el cual ha sido eficaz en ratones para incorporar varios genes exógenos a las células del epitelio respiratorio. La mayoría de los trabajos se han centrado en la fibrosis quística y en el déficit de  $\alpha_1$ -antitripsina. En los experimentos realizados se ha podido observar una transducción eficaz y una permanencia considerable del virus recombinante. El gen de la fibrosis quística se ha introducido en células epiteliales respiratorias mediante otros métodos, que incluyen la transferencia mediante liposomas, consiguiendo corregir eficazmente el defecto del gen de la fibrosis quística en los ratones. En varios países existen protocolos clínicos de terapia génica para la fibrosis quística.

La intensidad con la que se realicen experimentos en el campo de la terapia génica en células epiteliales respiratorias puede marcar la vía que se ha de seguir en otros procesos. Es muy posible que puedan emplearse las células epiteliales respiratorias (nasales o traqueales) para introducir otros genes. El sistema que se está desarrollando en la terapia con adenovirus y liposomas implica la utilización de nebulizadores, constituyendo una vía rápida con fácil acceso a células diana.

### Trastornos de la coagulación

La mayoría de las enfermedades de la coagulación han de poder ser corregidas mediante terapia génica. Las células diana adecuadas son aquellas que permiten realizar experimentos *ex vivo*, para posteriormente contactar, de forma eficaz, con las células del torrente circulatorio. Se han transducido eficazmente fibroblastos, miocitos y queratinocitos. Los retrovirus se han aplicado de forma eficaz en queratinocitos. Sin embargo, el principal problema estriba en la eficacia de la expresión de los genes transducidos. Los mioblastos transducidos con el gen del factor IX de la coagulación producen concentraciones eficaces de dicho factor durante unos 6 meses tras la inyección intramuscular de los mioblastos transducidos. A pesar del enorme avance realizado, existen muchas dificultades que aún se deben superar, algunas de las cuales estriban en la complejidad de ciertos genes, como es el caso del factor VIII, y la posibilidad del empleo de métodos *in vivo* para introducir los genes.

### Trastornos del SNC

Las enfermedades del SNC merecen una consideración especial. Las principales dificultades en el desarrollo de la terapia génica para trastornos del SNC derivan de la falta de conocimiento del defecto molecular y de la función bioquímica alterada. La inaccesibilidad del órgano y de la mayoría de sus células representa otra seria dificultad. Por último, muchos de los procesos que afectan al SNC son multigénicos o multifactoriales. Probablemente, la utilización de virus con cierto neurotropismo, como los de la familia *herpes*, permitirá vehicular los genes en las células del SNC en las que éstos deban expresarse. El reciente descubrimiento de muchos genes implicados en trastornos neurológicos permitirá abrir la puerta a la investigación en terapia génica para este grupo de enfermedades. Éste es el caso de la corea de Huntington, la ataxia dominante tipo 1, la neurofibromatosis 1 y 2, la distrofia miotónica, el retraso mental ligado al síndrome del cromosoma X frágil, la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, etc. En algunos casos se tratará de anular una función anómala debida a la mutación. En otras situaciones, la introducción del gen que no funciona proporcionará la correc-

ción del fenotipo anómalo. Sin duda, en los próximos 5 años se producirán grandes avances con traducción clínica para pacientes que en la actualidad no tienen tratamiento.

### Trastornos neoplásicos

El cáncer debe ser considerado una enfermedad genética. Los estudios sobre el papel de los oncogenes y los factores del crecimiento en el desarrollo y la proliferación celulares han permitido mejoras considerables en el empleo de las terapéuticas convencionales antineoplásicas. Sin embargo, los modelos genéticos más interesantes han venido de la mano de los *genes supresores* o *antioncogenes*. El retinoblastoma y el tumor de Wilms se deben a mutaciones en genes recesivos, siendo necesaria la presencia de dos genes mutados para el desarrollo del tumor. De este modo, sería posible revertir e incluso reparar la expresión de las células tumorales mediante la introducción de un gen normal. El aislamiento de los genes del retinoblastoma, del tumor de Wilms, APC, MCC, DCC, de la neurofibromatosis 1 y 2, de la enfermedad de Von Hippel-Lindau, entre otras (véase el capítulo correspondiente) abre enormes perspectivas a la terapia génica y para el control de numerosos procesos neoplásicos. En ciertas situaciones, la detección de predisposición para desarrollar un cáncer determinado puede ser motivo suficiente para introducir una copia adicional del gen lesionado, con el fin de prevenir el desarrollo tumoral.

En contraste con lo que sucede con los genes recesivos del cáncer, la inactivación del efecto dominante de una mutación en un *oncogén* será una labor mucho más difícil. Hasta ahora se han empleado secuencias complementarias al RNA patológico con el objeto de bloquear la expresión del gen mutado. Una de las principales dificultades estriba en la estabilidad de las secuencias introducidas y en la existencia de vectores que permitan una transferencia adecuada.

En la enfermedad neoplásica la terapia génica actual puede complementarse desde distintos aspectos: *a)* la sustitución de las células neoplásicas por células corregidas genéticamente o *b)* la introducción de células modificadas en el organismo, capaces de controlar el crecimiento de las células tumorales. Las terapias potenciales actuales en cáncer se han centrado en el segundo aspecto. Se ha trabajado en la modificación genética de los linfocitos específicos de tumor y en las células tumorales. Se han desarrollado linfocitos infiltrantes de tumor para depositar, en el lugar en el que se encuentra el tumor, grandes cantidades de citocinas y otros productos génicos con actividad antitumoral, los cuales tendrían toxicidad *in vivo*. La primera experiencia de terapia génica en cáncer en seres humanos se realizó en 1991. A pesar de la eficacia inicial obtenida, la capacidad de los linfocitos para llegar al tumor o el mecanismo de actividad antitumoral no se ha establecido de forma adecuada.

Se han realizado experimentos de transducción de células tumorales para facilitar su capacidad en la generación de una respuesta inmune. La expresión de ciertas citocinas y otros productos puede facilitar el rechazo por parte del organismo de las células tumorales. El desarrollo de las denominadas "vacunas" tumorales supone una importantísima vía de investigación en la terapia génica del cáncer. Otras vías de terapia génica en el cáncer incluyen: *a)* introducir genes supresores de tumores en los propios tumores; *b)* inhibir la expresión de oncogenes en las células tumorales; *c)* hacer resistentes a las células de la médula ósea a los efectos tóxicos de la quimioterapia, y *d)* introducir agentes tóxicos en las células tumorales.

### Otras aplicaciones

Una de las enfermedades humanas candidatas a la terapia génica es el déficit de hormona de crecimiento. Sin embargo, los mecanismos de control sobre la expresión de los genes de la mayoría de las hormonas no son bien conocidos todavía, con lo que la obtención de concentraciones correctas

de producción hormonal es difícil. De este modo, parece claro que, en estas situaciones, es mucho más sencillo recurrir a la ingeniería genética para obtener cantidades suficientes de hormona para la administración terapéutica a los pacientes.

Finalmente, para enfermedades no genéticas también es posible que la terapia génica pueda aportar nuevas formas de tratamiento, al poder convertir a las células modificadas genéticamente en pequeñas factorías de producción y distribución de sustancias de interés biológico: factores trombolíticos, anticuerpos monoclonales, derivados de factores del complemento, factores neurotróficos, etc. Sin embargo, las mismas limitaciones señaladas para las hormonas deben aplicarse en el caso de otros productos de interés biológico que requieran concentraciones determinadas de proteína circulante.

## Terapia génica germinal y somática

La manipulación genética efectuada en una célula germinal o en un embrión se denomina *terapia génica germinal*, ya que es el material genético constitucional, que será transmitido a la descendencia de todas las células, el que resulta modificado.

La corrección genética efectuada sobre las células somáticas implica un cambio en el fenotipo de éstas, las cuales constituyen un grupo celular determinado. Este tipo de manipulación se denomina *terapia génica somática*, y en ella el material genético constitucional del individuo se mantiene inalterado.

En los experimentos de transferencia *germinal*, el DNA exógeno se incorpora a la totalidad de las células del organismo transgénico, mientras que en la transferencia *somática*, ésta se realiza en células de un tejido específico, las cuales son reimplantadas posteriormente en el animal de experimentación. Las células más frecuentemente utilizadas en experimentos de transferencia de genes son las de la médula ósea. Una de las principales ventajas es el cultivo fácil y la capacidad de reimplantación en el animal de experimentación. Otras células han mostrado gran utilidad, especialmente los fibroblastos y los hepatocitos.

La terapia génica somática tiene importantes aplicaciones en medicina ya que debe permitir corregir un volumen importante de defectos del genoma hereditarios o adquiridos. La aplicación de la terapia germinal al ser humano plantea indudables problemas éticos, pero su aplicación a la investigación en animales permite la posibilidad de desarrollar modelos experimentales de enfermedades humanas.

## Animales transgénicos

En los últimos 10 años se ha producido un enorme desarrollo en la obtención de animales transgénicos, que constituyen herramientas de gran valor en la investigación biomédica. En los primeros experimentos se transformaron embriones de ratón con DNA en virus SV40 o retrovirus, en el estadio de blastocito. En 1980 se empleó la inyección en el pronúcleo de DNA transgénico en el genoma del ratón, consiguiéndose posteriormente determinar la expresión de los genes integrados en los ratones transgénicos. El desarrollo de los animales transgénicos ha proporcionado a los investigadores la posibilidad de producir proteínas funcionales y estudiar los mecanismos reguladores de la expresión de genes en el organismo. Los animales transgénicos han abierto las puertas a estudios como la diferenciación celular y tisular o la transformación neoplásica. Por otra parte, los animales transgénicos permiten la producción específica de proteínas con finalidades diagnósticas o terapéuticas.

Las áreas de investigación de los animales transgénicos son muy amplias, incluyendo autoinmunidad, afecciones cardiovasculares, metabolismo, biología del desarrollo, factores de crecimiento, etc. Desde el punto de vista práctico se están desarrollando animales transgénicos para obtener órganos para trasplantes, estudio de actividad de mutagénesis,

desarrollo de vacunas, modelos de resistencia a las enfermedades y producción de anticuerpos monoclonales humanos.

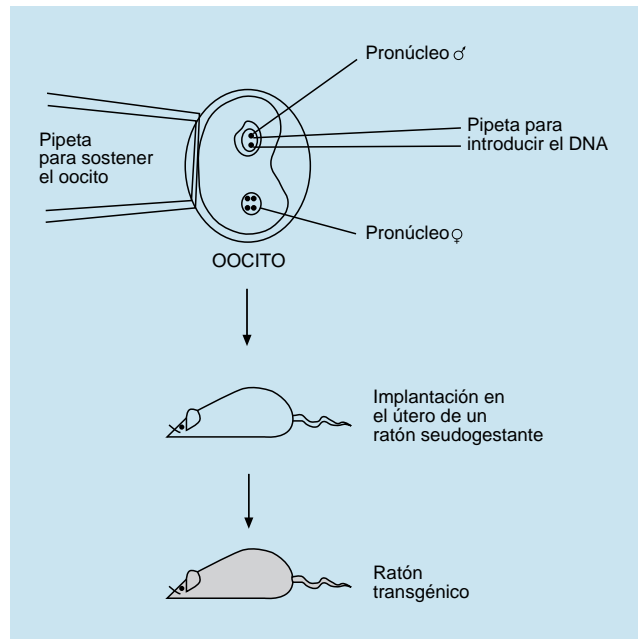
**Recombinación homóloga**

La recombinación homóloga permite el intercambio de material genético entre los dos fragmentos de DNA que contienen secuencias idénticas. Se produce durante la integración en el lugar cromosómico normal de un gen o de una porción de éste introducido en una célula. La recombinación homóloga constituye uno de cada 500-2.000 de los fenómenos de recombinación que se producen al azar (fig. 9.77). Entre las aplicaciones de la recombinación homóloga al estudio y tratamiento de las enfermedades genéticas se debe citar: a) la obtención de animales transgénicos en los que se modifica de forma dirigida una región determinada del DNA; b) la terapia génica somática; c) la creación de modelos animales de enfermedades humanas determinadas genéticamente; d) el estudio de genes implicados en el desarrollo, y e) la producción de anticuerpos monoclonales humanos.

La microinyección pronuclear constituye la técnica de elección para la producción de animales transgénicos, aunque durante los últimos años se han descrito y aplicado otros métodos (retrovirus, microinyección de fragmentos cromosómicos, transfección de espermatozoides y fertilización *in vitro*) (fig. 9.78). En el ratón, las técnicas pronucleares se están reemplazando progresivamente por la introducción de células progenitoras embrionarias en embriones receptores en estadio de blastocito. En estos experimentos se usan secuencias homólogas a regiones genómicas del genoma receptor. Las regiones homólogas del animal transgénico favorecen la recombinación homóloga dirigida en las células en cultivo, en la que las células embrionarias indiferenciadas permiten la selección de las células que contienen los recombinantes.

**Modelos animales de enfermedades humanas y terapia génica**

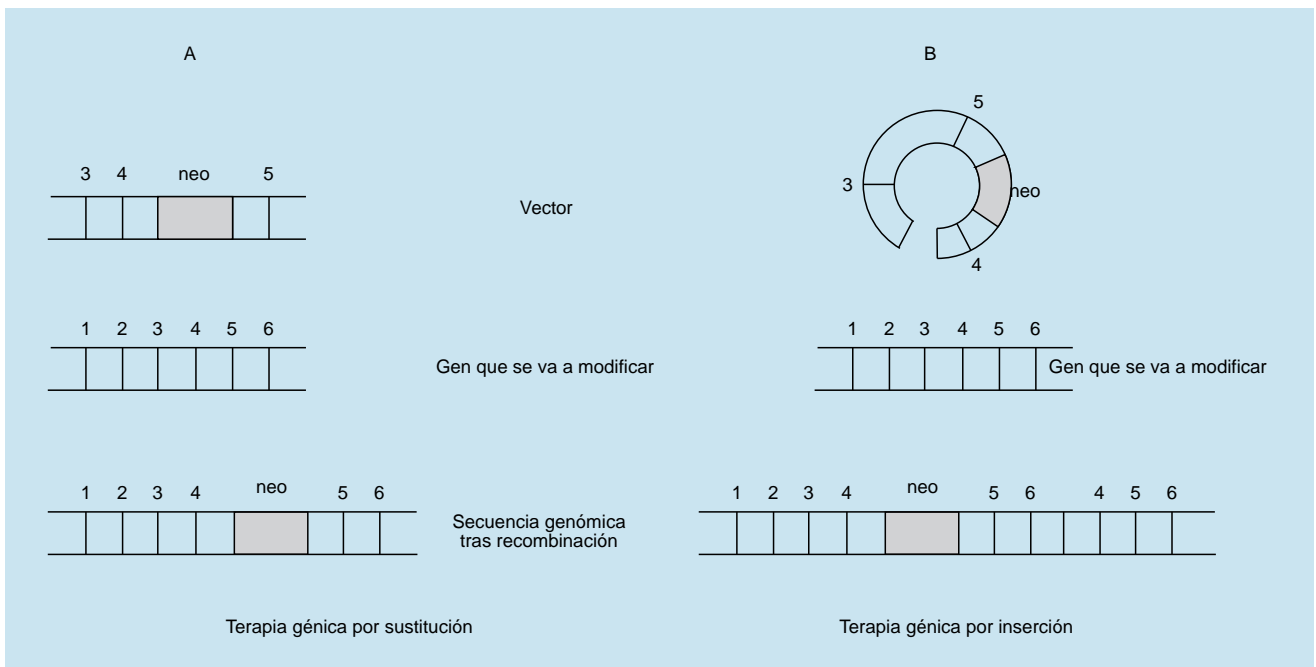
La obtención de modelos animales para enfermedades humanas permite la realización de experimentos que serían imposibles en el hombre, a la vez que facilita el conocimiento de la fisiopatología de estos procesos. El empleo de la tecnología de animales transgénicos ha permitido obtener mode-



**Fig. 9.78.** Obtención de un ratón transgénico. Mediante una micropipeta se inyecta la secuencia de DNA que se va a integrar en el pronúcleo masculino. El oocito se implanta en el útero de una hembra ratón pseudogestante. El animal que nacerá debe poseer en cada célula una copia del gen inyectado en el oocito.

los de enfermedades humanas, en los que se han creado mutaciones equivalentes a mutaciones en seres humanos o se han eliminado determinados genes. Recientemente se han transferido cromosomas artificiales en levadura a células embrionarias indiferenciadas de ratón, obteniendo la integración a nivel germinal de estructuras génicas humanas de gran tamaño. Estos experimentos permitirán el estudio detallado de la expresión de los genes de forma mucho más adecuada que la actual.

En los experimentos realizados sobre animales portadores de defectos genéticos los resultados obtenidos han sido muy



**Fig. 9.77.** Terapia génica mediante recombinación homóloga. A. Terapia génica de sustitución de una secuencia por otra. B. Terapia génica por inserción sin eliminar la secuencia que se va a modificar. (Tomada de CAPECCHI MR. Science 1989; 244: 1.288-1.292.)



satisfactorios, consiguiendo corregir el defecto de un modo eficaz en la mayoría de las situaciones. En estos casos se han realizado las correcciones de los defectos inyectando el DNA genómico o complementario (cDNA) que contiene el gen de interés en el interior de huevos fecundados o de embriones. En el ratón se ha logrado corregir varios defectos de la respuesta inmune mediante la terapia génica germinal, así como el déficit de ornitina-carbamiltransferasa, betatalasemia, fibrosis quística, distrofia muscular de Duchenne, etc.

Las mutaciones en genes homólogos a los seres humanos de otros organismos tienen gran interés. Sin embargo, estos defectos son poco numerosos, con lo que se debe recurrir al desarrollo de cepas de animales portadores de tales mutaciones, para poder estudiar mejor la fisiopatología y la patogenia de las distintas enfermedades genéticas que afectan al hombre. En los últimos años se han desarrollado varios de estos modelos mediante la integración de DNA exógeno clonado, en el genoma del pronúcleo de un oocito fecundado de ratón. Las mutaciones transmitidas a las células germinales implican su transmisión a la descendencia, pudiendo disponer de un modelo para la enfermedad. Empleando distintas metodologías se ha conseguido crear modelos de ratones transgénicos para el síndrome de Lesch-Nyhan, la anemia de células falciformes, la betatalasemia, el retinoblastoma, la leucemia mieloide crónica y la fibrosis quística, entre otros procesos.

## Consideraciones éticas de la terapia génica

Como en cualquier ensayo de un nuevo tratamiento en medicina, los estudios sobre terapia génica en seres humanos se realizan sin un conocimiento total y con grandes imperfecciones. Existe un consenso internacional sobre la terapia génica en humanos con fines terapéuticos, en el sentido de que ésta debe tener como objetivo principal mejorar la lucha contra la enfermedad. De este modo, la mayoría de los gobiernos y las organizaciones médicas están de acuerdo en que debe realizarse la manipulación genética de las células somáticas con el objeto de obtener una mejoría clínica de los pacientes.

En 1989 se realizó el primer experimento de manipulación genética de linfocitos infiltrantes de tumor tras infección *in vitro* con un retrovirus que expresa el gen *neo*, empleado como marcador selectivo, y la reimplantación posterior en las células neoplásicas donantes de los pacientes. Desde entonces, existen varios protocolos clínicos de terapia génica que incluyen enfermedades hereditarias, cáncer y SIDA. Las informaciones obtenidas con estos estudios debe orientar, en gran parte, los futuros experimentos que se realicen en este campo.

Si bien la modificación genética de las células somáticas tiene unas finalidades claras en el control de las enfermedades, el papel de la manipulación de las células germinales en el hombre deberá afrontarse sólo tras disponer del control de todas las particularidades de la terapia génica en células somáticas. Finalmente, si bien está fuera de dudas que la transferencia génica con finalidades terapéuticas está totalmente justificada, a pesar de las limitaciones actuales en el conocimiento global del sistema, su empleo con el objetivo de corregir las características de un individuo es un tema fuera de toda defensa. Un aspecto distinto es el de la prevención de una enfermedad mediante corrección génica, no accesible actualmente, pero que deberá plantearse en un futuro.

## Producción de proteínas por ingeniería genética

Para ciertas enfermedades hereditarias existe la posibilidad de realizar un tratamiento sustitutivo mediante la admi-

nistración de la proteína deficitaria. Aunque siempre es deseable disponer de la proteína de origen humano, existen considerables problemas de disposición y de contaminación. En el caso de la hemofilia A, se administran concentrados de factor VIII, el cual se obtiene a partir de miles de muestras de donantes de sangre. Los pacientes hemofílicos han sido contaminados a menudo por los virus de las hepatitis B y C, así como por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) causante del SIDA.

Para las enfermedades en las que existe un tratamiento sustitutivo, pero para las que la terapia génica no es todavía posible, la producción de la proteína mediante ingeniería genética permite superar la mayoría de los problemas de la terapia sustitutiva actual, a la vez que permite disponer de cantidades inagotables de proteína con fines terapéuticos.

En la [tabla 9.26](#) se relacionan algunas de las proteínas que se producen mediante ingeniería genética de utilidad terapéutica. La ingeniería genética permite también la obtención de vacunas en las que sólo se produce la proteína o fracción proteica vírica, necesaria para la inducción de la reacción inmunológica.

En los experimentos iniciales para la producción de proteínas humanas mediante ingeniería genética se emplearon vectores de expresión en el seno de bacterias. Los vectores de expresión consisten en un plásmido capaz de reproducirse de forma rápida, dando lugar a un gran número de copias. El plásmido debe contener un promotor, el cual es generalmente el promotor de los genes de la  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*), el operón triptófano (*trp*) o el gen de resistencia a la ampicilina ( *$\beta$ -lactamasa*). El gen de la proteína que se va a producir se introduce justo al principio de la secuencia codificante para la proteína asociada al promotor. Una vez que se obtienen los clones bacterianos productores de la proteína deseada se puede proceder a su producción a gran escala.

Uno de los principales problemas es la eficacia de la producción por parte de las bacterias. Es posible introducir secuencias que refuerzan la acción del promotor. Del mismo modo, debido a que un mismo aminoácido puede ser sintetizado por codones distintos, existen codones que pueden aumentar la rapidez de la traducción proteica.

Otro problema estriba en evitar que la propia bacteria elimine la proteína extraña que se le ha hecho sintetizar. Este problema puede ser solucionado obteniendo proteínas híbridas en las que existe un componente bacteriano o utilizando bacterias mutadas en las que las actividades proteolíticas se encuentran reducidas.

Las proteínas que deben ser modificadas posteriormente tras la traducción para que ejerzan su actividad normal no pueden ser sintetizadas en el interior de las bacterias, ya que éstas no poseen los recursos enzimáticos necesarios. De este modo, es preciso proceder a la síntesis de estas proteínas en el seno de células eucariotas. Los vectores que se utilizan de-

**TABLA 9.26.** Relación de algunas de las proteínas producidas mediante ingeniería genética de utilidad en terapia humana

Activador tisular del plasminógeno
Antitrombina III
$\alpha_1$ -antitripsina
Eritropoyetina
Factor VIII de la coagulación
Factor IX de la coagulación
Factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF)
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)
Factor de necrosis tumoral (TNF)
Hormona del crecimiento
Insulina
Interferones $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$
Interleucinas
Lipocortina
Proteína C
Urocinasa
Vacuna contra la hepatitis B

ben poseer potentes promotores y secuencias *enhancer* que aumenten considerablemente la transcripción. Por otra parte, los experimentos realizados con ciertas proteínas han permitido observar que existen regiones proteicas que no son estrictamente necesarias para su función, pudiendo eliminar las secuencias de DNA que codifican para estas porciones no imprescindibles para la función biológica. Otro de los problemas en la producción *in vitro* de proteínas deriva de la especificidad celular en las modificaciones que son necesarias para la obtención del producto biológicamente activo. En ciertos casos sólo un tejido determinado es capaz de tales modificaciones. Por último, el cultivo y la proliferación de la mayoría de las células eucariotas diferenciadas sólo son posibles si éstas han sido sometidas a transformación mediante infección vírica.

Recientemente se ha podido comprobar la posibilidad de la producción de hormonas y proteínas séricas en células distintas de las normales. La transferencia de genes *in vitro* es la base para la terapia génica de las hemofilias, los déficit hormonales, algunas formas de diabetes insulino dependiente y el déficit de  $\alpha_1$ -antitripsina. En los experimentos que se han realizado en animales, los genes introducidos en éstos son capaces de expresar su producto proteico, a pesar de encontrarse en tejidos distintos a los normales.

Sin duda, el avance que se producirá en el contexto de las investigaciones del Proyecto Genoma Humano proporcionará conocimientos y herramientas que permitirán una medicina terapéutica muy distinta a la actual, la cual será accesible en un plazo relativamente corto. El desarrollo de nuevas formas de tratamiento de las enfermedades, ya sea mediante la modificación del genoma o empleando elementos biológicos producidos mediante ingeniería genética, requiere múltiples ensayos que no pueden detenerse, pero para los que es necesario un control muy estricto y ágil por parte de las sociedades científicas y de los beneficiarios de los avances que se deriven.

#### *Bibliografía especial*

- ANDERSON WF. Human gene therapy. *Science* 1992; 256: 808-813.  
DALEY CQ, VAN ETTEN RA, BALTIMORE D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by p210<sup>bcr/abl</sup> gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990; 247: 824-830.

- GOSSEN J, VIJG J. Transgenic mice as model systems for studying gene mutations in vivo. *TIG* 1993; 9: 27-31.  
GREAVES DR, FRASER P, VIDAL MA, HEDGES MJ, ROPERS D, LUZZATTO L et al. A transgenic mouse model of sickle cell disorder. *Nature* 1990; 343: 183-185.  
JAKOBOVITS A, MOORE AL, GREEN LL, VERGARA GJ, MAYNARD-CURRIE CE, AUSTIN HA et al. Germ-line transmission and expression of a human-derived yeast artificial chromosome. *Nature* 1993; 362: 255-258.  
JIAO S, GUREVICH V, WOLFF JA. Long term correction of rat model of Parkinson's disease by gene therapy. *Nature* 1993; 362: 450-453.  
MULLIGAN RC. The basic science of gene therapy. *Science* 1993; 260: 926-932.  
SMITHIES O. Animal models of human genetic diseases. *TIG* 1993; 9: 112-116.  
WU CL, MELTON D. Production of a model for Lesch-Nyhan syndrome in hypoxanthine phosphoribosyltransferase-deficient mice. *Nat Genet* 1993; 235-240.

#### *Bibliografía general*

- ANDERSON WF. Human gene therapy. *Science* 1992; 256: 808-813.  
BARBACID M. Mutagens, oncogenes and cancer. *Trends Genet* 1986; 2: 188-192.  
CASKEY CT, PIZZUTI A, FU YH, FENWICK RG, NELSON DL. Triplet repeat mutations in human disease. *Science* 1992; 256: 784-789.  
CONNOR JM, FERGUSON-SMITH MA. *Essential medical genetics*, 4.<sup>a</sup> ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1993.  
CHUMAKOV I, RIGAUULT P, GUILLLOU S, OUGEN P, BILLAUT A, GUASCONI G et al. Continuum of overlapping clones spanning the entire human chromosome 21q. *Nat Genet* 1992; 359: 380-387.  
DAVIES KE. *Human genetic diseases. A practical approach*. Oxford, Washington DC, IRL Press, 1986.  
KNUDSON AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10.914-10.921.  
McKUSICK VA. *Mendelian inheritance in man. Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes*, 10.<sup>a</sup> ed. Baltimore, Londres, Johns Hopkins University Press, 1992.  
MULLIGAN RC. The basic science of gene therapy. *Science* 1993; 260: 926-932.  
WEATHERALL DJ. *The new genetics and clinical practice*, 3.<sup>a</sup> ed. Oxford, Oxford University Press, 1991.  
WEISSENBACH J, GYAPAY G, DIEB C, VIGNAL A, MORISSETTE J, MILLASSEAU P et al. A second generation linkage map of the human genome. *Nature* 1992; 359: 794-801.  
YUNIS JJ. The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 1983; 221: 227-236.



**Volver al índice**