BIB003699

NUEVA GENÉTICA CLÍNICA

ANDREW READ • DIAN DONNAI

616.042
R282n
Ej.1

OMEGA

NUEVA GENÉTICA CLÍNICA

ANDREW READ
DIAN DONNAI

Departamento de Genética médica, Universidad de Manchester
St Mary's Hospital, Manchester, Reino Unido

Coordinador de la traducción

José Miguel García Sagredo

Profesor asociado de la Universidad de Alcalá de Henares
Servicio de Genética médica del Hospital Ramón y Cajal de Madrid

Traducción

Concepción Villalón Villarroel
María Talavera Yagüez
Eva García Galloway

Servicio de Genética médica del Hospital
Ramón y Cajal de Madrid

UH UNIVERSIDAD HISPANOAMERICANA
Biblioteca
Sede Aranjuez

EDICIONES OMEGA

Índice de materias

Abreviaturas xvii

Prólogo xix

Cómo utilizar este libro xx

Capítulo 1 – ¿Qué podemos aprender de la historia familiar?

1.1 Historias clínicas 1
Caso 1 – Familia Ashton 1
Caso 2 – Familia Brown 2
Cuadro 1.1 – Efectos pleiotrópicos de la fibrosis quística 3
Caso 3 – Familia Choudhary 3
Caso 4 – Familia Davies 4
Caso 5 – Familia Elliot 4
Caso 6 – Familia Fletcher 5

1.2 Antecedentes 6
Cuadro 1.2 – Cómo hacer la historia familiar y dibujar un árbol genealógico 6

1.3 Estudio de pacientes 6
Caso 1 – Familia Ashton 7
Caso 2 – Familia Brown 8
Caso 3 – Familia Choudhary 9
Cuadro 1.3 – Parentesco 10
Caso 4 – Familia Davies 10
Caso 5 – Familia Elliot 11
Caso 6 – Familia Fletcher 12

1.4 Resumen y ampliación 13
El arte de la interpretación del árbol genealógico 13
Cuadro 1.4 – Resumen de los modos de herencia 14
Penetrancia y expresividad. Riesgos en la interpretación y el consejo 16
Cuadro de enfermedad 1 – Neurofibromatosis tipo 1 18
Modos de herencia poco frecuentes 18
Otros problemas en la interpretación del árbol genealógico 20
Mosaicismo 21

1.5 Referencias 22
Páginas web útiles 22

1.6 Ejercicios de autoevaluación 22

Capítulo 2 – ¿Cómo se pueden estudiar los cromosomas de los pacientes?

2.1 Historias clínicas 25
Caso 7 – Familia Green 25
Caso 8 – Familia Howard 26
Caso 9 – Familia Ingram 26

2.2 Antecedentes 27
Por qué se necesita conocer los cromosomas 27
¿Cómo se estudian los? 27

Cuadro 2.1 – Material para análisis cromosómicos 28
Cuadro 2.2 – Anomalías cromosómicas: nomenclatura y glosario 29
Anomalías cromosómicas 30
¿Por qué tenemos cromosomas? 30
Cuadro 2.3 – Síndromes producidos por anomalías numéricas de los cromosomas 32
Cuadro 2.4 – Síndromes de microdeleción "recurrentes" 33
Centrómeros y telómeros 33
Comportamiento de los cromosomas en la división celular 34

2.3 Estudio de pacientes 38
Caso 7 – Familia Green 38
Caso 8 – Familia Howard 38
Caso 9 – Familia Ingram 41
Caso 5 – Familia Elliot 42

2.4 Resumen y ampliación 45
¿Qué son los cromosomas? 45
Anomalías cromosómicas numéricas y estructurales 46
Anomalías equilibradas y desequilibradas 47
Anomalías constitucionales y mosaicos 50
Cuadro de enfermedad 2 – Talasemia alfa/síndrome de retraso mental 51

2.5 Referencias 52
Páginas web útiles 53

2.6 Ejercicios de autoevaluación 53

Capítulo 3 – ¿Cómo funcionan los genes?

3.1 Historias clínicas 55
Caso 10 – Familia Johnson 55

3.2 Antecedentes 56
Estructura de los ácidos nucleicos 57
Cuadro 3.1 – Apunte sobre unidades 58
La estructura de los genes: exones e intrones 58
Cuadro 3.2 – Los extremos 5′ y 3′ 59
Procesamiento (*splicing*) del tránscrito primario 60
Traducción y código genético 61
Cuadro 3.3 – El patrón de lectura 62
La traducción no es el final de la historia 62
Cuadro 3.4 – Microfibrillas: del gen a la estructura multiproteica 63

3.3 Estudio de pacientes 64
Caso 5 – Familia Elliot 64
Caso 10 – Familia Johnson 64
Caso 1 – Familia Ashton 65
Caso 2 – Familia Brown 65
Caso 3 – Familia Choudhary 66
Caso 4 – Familia Davies 66
Caso 6 – Familia Fletcher 67
Caso 7 – Familia Green 68
Caso 8 – Familia Howard 68
Caso 9 – Familia Ingram 68

3.4 Resumen y ampliación 68
Algo de química 68
Cuadro 3.5 – Fórmula química de las bases A, G, C, T y U 69
Los genes son más grandes de lo que se piensa 69
Cuadro 3.6 – Estructura de la proteinas 70
Encendido y apagado de genes. La transcripción y sus controles 70
Un gen a menudo codifica más de una proteína 72
Cuadro 3.7 – El Proyecto Genoma Humano 73

¿Qué hace todo su ADN? 75
¿Un mundo oculto de ARN? 76
Cuadro de enfermedad 3 – Síndrome de Williams-Beuren 77

3.5 Referencias 78
Conceptos generales 78
Páginas web útiles 79

3.6 Ejercicios de autoevaluación 79

Capítulo 4 – ¿Cómo se puede estudiar el ADN de los pacientes?

4.1 Historias clínicas 81
Caso 11 – Familia Kavanagh 81
Caso 12 – Familia Lawton 82
Caso 13 – Familia Murphy 83
Cuadro 4.1 – Malformaciones, deformaciones, displasias, síndromes 84

4.2 Antecedentes 84
Hibridación de ácidos nucleicos 84
Utilización de la hibridación como base en el análidis de ADN 85
Cuadro 4.2 – Principios del *Southern blotting* 87
Cuadro 4.3 – Endonucleasas de restricción 90
Cuadro 4.4 – Gel de electroforesis 91
Ampliación de secuencias de interés 91
Cuadro 4.5 – Ampliación de una secuencia por clonación 92
La reacción en cadena de la polimerasa 93
Cuadro 4.6 – Entender la PCR 95

4.3 Estudio de pacientes 96
Casos estudiados utilizando un protocolo de hibridación 97
Caso 11 – Familia Kavanagh 97
Caso 12 – Familia Lawton 98
Caso 7 – Familia Green 99
Caso 8 – Familia Howard 100
Caso 13 – Familia Murphy 100
Casos estudiados utilizando PCR 101
Caso 9 – Familia Ingram 101
Caso 4 – Familia Davies 102
Caso 1 – Familia Ashton 104

4.4 Resumen y ampliación 106
PCR cuantitativa 107
PCR en tiempo real 107
Análisis del ARN 108
Esudio de proteínas 109
Pintado de cromosoma 109
Cuadro de enfermedad 4 – Enfermedades causadas por la expansión de repeticiones de nucleótidos 110

4.5 Referencias 112
Páginas web útiles 112

4.6 Ejercicios de autoevaluación 113

Capítulo 5 – ¿Cómo podemos estudiar el ADN en busca de mutaciones?

5.1 Historias clínicas 115
Caso 14 – Familia Nicolaides 115

5.2 Antecedentes 116
Secuencia del ADN – el análisis definitivo 116
Cuadro 5.1 – Técnica de secuenciación manual original de Sanger 119
Métodos para detectar cambios específicos en secuencias 120

Métodos de búsqueda de cambios de secuencia en un gen 122
Métodos para detectar deleciones o duplicaciones en exones completos 124

5.3 Estudio de pacientes 126
Las historias hasta ahora... 126
Caso 2 – Familia Brown 126
Cuadro 5.2 – Pequeña guía sobre la nomenclatura de las mutaciones 129
Caso 14 – Familia Nicolaides 129
Caso 6 – Familia Fletcher 131

5.4 Resumen y ampliación 132
Las tres preguntas 132
Detección de mutaciones utilizando chips 134
Otros métodos para genotipar o secuenciar el ADN 135

5.5 Referencias 135
Cuadro de enfermedad 5 – Síndrome QT largo 136

5.6 Ejercicios de autoevaluación 138

Capítulo 6 – ¿Qué hacen las mutaciones?

6.1 Historias clínicas 141
Caso 15 – Familia O'Reilly 141

6.2 Antecedentes 142
Cuadro 6.1 – Resumen de los tipos de mutaciones estudiados en esta sección 143
Deleción o duplicación de un gen entero 143
Interrupción de un gen 143
Mutaciones que afectan la trascripción de una secuencia codificante intacta 144
Mutaciones que afectan al splicing del primer transcrito 145
Mutaciones que causan errores en la traducción 147
Mutaciones que producen sustituciones de aminoácidos 149

6.3 Estudio de pacientes 150
Caso 1 – Familia Ashton 150
Caso 2 – Familia Brown 151
Caso 4 – Familia Davies 151
Caso 6 – Familia Fletcher 152
Caso 11 – Familia Kavanagh 152
Caso 14 – Familia Nicolaides 153
Caso 15 – Familia O'Reilly 154
Cuadro 6.2 – Biosíntesis del colágeno 155

6.4 Resumen y ampliación 156
Cambios de pérdidas de función y ganancias de función 157
¿Dominante o recesivo? 160
Entender el fenotipo 159
Correlaciones genotipo-fenotipo 160
Cuadro 6.3 – Correlación genotipo-fenotipo en mutaciones de los genes *FGFR* 161
Predecir el fenotipo: los problemas de nuevos cambios de pérdida de sentido 164
Sensibilidad a dosis y patología de las anomalías cromosómicas 164
Mutaciones somáticas 166
¿Cómo aparecen las mutaciones? 166
Cuadro de enfermedad 6 – Patología molecular de las variantes del gen receptor de andrógenos 167

6.5 Referencias 169
Páginas web útiles 169

6.6 Ejercicios de autoevaluación 169
Cuadro 6.3 – Secuencia parcial del gen *PAX3* para los ejercicios de autoevaluación 170

Capítulo 7 – ¿Qué es la epigenética?

7.1 Historias clínicas 173
Caso 16 – Familia Portillo 173
Cuadro 7.1 – Tipos y funciones de los linfocitos 174
Caso 17 – Familia Qian 174
Caso 18 – Familia Rogers 175

7.2 Antecedentes 175
Compensación de dosis del cromosoma X 176
Imprinting: por qué necesita una madre y un padre 177
La herramienta para la inactivación del X y el *imprinting*: la metilación del ADN 178
Estudio de la metilación del ADN 180

7.3 Estudio de pacientes 181
Caso 4 – Familia Davies 181
Caso 9 – Familia Ingram 182
Caso 16 – Familia Portillo 183
Casos 17 – Familia Qian y 18 – Familia Rogers 185

7.4 Resumen y ampliación 190
La CpG como un "punto caliente" de mutaciones 190
La inactivación del X tiene implicaciones en mujeres portadoras de una traslocación X:autosoma 191
Otras enfermedades relacionadas con el *imprinting* 192
¿Qué propósito tiene el *imprinting*? 193
¿Qué importancia tienen los efectos epigenéticos? 193
Cuadro de enfermedad 7 – Síndrome de Rett 194

7.5 Referencias 195

7.6 Ejercicios de autoevaluación 196

Capítulo 8 – Efecto de los genes en el metabolismo, la respuesta a los medicamentos y el sistema inmunitario

8.1 Historias clínicas 199
Caso 19 – Familia Stott 199
Caso 20 – Familia Tierney 200

8.2 Antecedentes 200
Errores innatos del metabolismo 201
Cuadro 8.1 – Algo de historia 203
Farmacogenética 204
Cuadro 8.2 – Deleciones y conversiones génicas en la deficiencia de la 21-hidroxilasa 206
Inmunogenética 208

8.3 Estudio de pacientes 210
Caso 19 – Familia Stott 210
Caso 20 – Familia Tierney 213
Caso 16 – Familia Portillo 214

8.4 Resumen y ampliación 216
Errores innatos de metabolismo 216
Cuadro 8.3 – Incapacidad para producir vitamina C: un error innato universal en humanos 217
Cuadro 8.4 – Intolerancia a la lactosa: un polimorfismo metabólico común 218
Farmacogenética 220
Inmunogenética 222
Cuadro de enfermedad 8 – Las porfirias 224

8.5 Referencias 226

8.6 Ejercicios de autoevaluación 227

Capítulo 9 – ¿Cómo se identifican los genes de las enfermedades mendelianas?

9.1 Historias clínicas 229
Discromatosis simétrica hereditaria 229

9.2 Antecedentes 230
Cuadro 9.1 – Identificación de genes a través de su proteína producto 231
Fundamentos del mapeo de genes 232
Problemas especiales del mapeo genético en humanos 234
Protocolo para buscar ligamientos 236
Analizar los genes candidatos en busca de mutaciones 237

9.3 Estudio de pacientes 238
Discromatosis simétrica hereditaria 238
Caso 3 – Familia Choudhary 242

9.4 Resumen y ampliación 244
Utilización de las anomalías cromosómicas para sugerir una región o un gen candidato 244
Seguimiento de un gen: marcadores de ligamiento para predecir los riesgos en un árbol genealógico 244
Cuadro de enfermedad 9 – Síndrome de Rubinstein–Taybi 246

9.5 Referencias 248
Conceptos generales 248

9.6 Ejercicios de autoevaluación 248

Capítulo 10 – ¿Por qué unas enfermedades son frecuentes y otras son raras?

10.1 Historias clínicas 251
Caso 21 – Familia Ulmer 251

10.2 Antecedentes 252
Cuadro 10.1 – La distribución de Hardy-Weinberg 253
Hardy–Weinberg para calcular el riesgo de los portadores 254
Cambio de frecuencias génicas 254
Factores determinantes de frecuencias génicas 255
Ventaja de la heterocigosis 257
¿Ventaja de la heterocigosis o efecto fundador? 258

10.3 Estudio de pacientes 259
Caso 21 – Familia Ulmer 259
Cuadro 10.2 – El riesgo de un hermano portador 260
Caso 3 – Familia Choudhary 260
Cuadro 10.3 – Cálculo de los efectos de parentesco 261

10.4 Resumen y ampliación 262
¿Cuál es la probabilidad de que la descendencia de un matrimonio consanguíneo tenga una enfermedad recesiva? 265
¿Podemos abolir las enfermedades genéticas? 265
Cuadro 10.4 – ¿Deberían las personas tratadas devolver su deuda a la sociedad no teniendo hijos? 266
Cuadro de enfermedad 10 – Enfermedades de judíos y finlandeses 267

10.5 Referencias 268

10.6 Ejercicios de autoevaluación 269

Capítulo 11 – ¿Cuándo es útil el cribado?

11.1 Historias clínicas 271
Caso 22 – Familia Vlasi 271

11.2 Antecedentes 272
El cribado frente a los tests diagnósticos 272
Cuadro 11.1 – Parámetros de un test de cribado 273
¿Cuándo se debe de hacer el cribado? 274
¿Quién debería ser cribado? 274
¿Cómo se debería hacer el cribado? 274

11.3 Estudio de pacientes 275
Caso 8 – Familia Howard 275
Caso 22 – Familia Vlasi 276
Cuadro 11.2 – ¿Cuál es el mejor diagnóstico prenatal para el síndrome de Down? 277
Caso 4 – Familia Davies 279
Caso 2 – Familia Brown 279
Caso 21 – Familia Ulmer 281

11.4 Resumen y ampliación 283
¿Que enfermedades deberían ser cribadas? 283
Cuadro 11.3 – Riesgo atribuible a la población 284
Cuadro 11.4 – Criterios utilizados por el Comité Nacional de Cribado del Reino Unido 285
Cuadro 11.5 – Análisis genético de "estilo de vida" 286
Cuadro de enfermedad 11 – Hipercolesterolemia familiar 290

11.5 Referencias 291
Páginas web útiles 291

11.6 Ejercicios de autoevaluación 292

Capítulo 12 – ¿El cáncer es genético?

12.1 Historias clínicas 293
Caso 23 – Familia Wilson 293
Caso 24 – Familia Xenakis 294

12.2 Antecedentes 295
Selección natural y evolución del cáncer 295
Cuadro 12.1 – Las seis capacidades esenciales de un tumor maligno 296
Vencer las defensas 296
Cuadro 12.2 – Inestabilidad cromosómica en células cancerosas 297
Vivir para siempre: la importancia de los telómeros 297
Oncogenes 299
Función y activación de oncogenes 300
Cuadro 12.3 – El cromosoma Philadelphia y el gen quimérico *BCR-ABL* 303
Genes supresores de tumores 303
Comprobar la hipótesis de los dos hits 304
La función normal de los genes supresores de tumores 307
Cuadro 12.4 – El punto de control G1-S 308
Una solución desesperada: apoptosis 310

12.3 Estudio de pacientes 310
Caso 20 – Familia Tierney 310
Caso 23 – Familia Wilson 311
Caso 24 – Familia Xenakis 315

12.4 Resumen y ampliación 317
Cáncer de colon hereditario no-polipósico 317
El desarrollo multipasos del cáncer 319
Epigenética en cáncer 320
¿Son realmente el cáncer de mama familiar y el cáncer de colon familiar enfermedades multifactoriales? 321
Perfil de expresión de los tumores 322
Cuadro de enfermedad 12 – Enfermedad de von Hippel–Lindau 324

12.5 Referencias 326
Páginas web útiles 327
12.6 Ejercicios de autoevaluación 327

Capítulo 13 – ¿Debería analizarse la susceptibilidad genética a enfermedades comunes?

13.1 Historias clínicas 329
Caso 25 – Familia Yamamoto 329
Caso 26 – Familia Zuabi 330
13.2 Antecedentes 331
Dos modelos de determinación genética 331
Dicotomía *versus* caracteres cuantitativos 332
Teoría poligénica 332
Investigar la genética de las enfermedades complejas 333
Cuadro 13.1 – Susceptibilidad poligénica a una enfermedad 334
Estudios de ligamiento para identificar factores de susceptibilidad 336
Detectar factores de susceptibilidad por asociación 337
13.3 Estudio de pacientes 340
Cuadro 13.2 – Asociación y ligamiento 341
Caso 25 – Familia Yamamoto 341
Cuadro 13.3 – Umbrales de significación en los estudios de ligamiento de todo el genoma 343
Caso 26 – Familia Zuabi 345
13.4 Resumen y ampliación 349
Problemas con los estudios de asociación 350
Un recurso para los estudios de asociación: el proyecto HapMap 352
Un riesgo en los estudios de asociación: todo depende de la enfermedad común. Hipótesis de la variante común 353
Si podemos identificar factores de susceptibilidad, entonces ¿qué? 354
Cuadro 13.4 – Un caso hipotético en 2010 356
Cuadro de enfermedad 13 – Autismo 358
13.5 Referencias 360
13.6 Ejercicios de autoevaluación 360

Capítulo 14 – ¿Qué podemos hacer con una enfermedad genética?

14.1 Historias clínicas 363
14.2 Antecedentes 363
Diagnóstico 363
Evaluación del riesgo y consejo genético 364
Cuadro 14.1 – Una introducción al cálculo bayesiano en genética 365
Análisis 366
Cuadro 14.2 – Protocolo para el test predictivo de la enfermedad de Huntington 368
Tratamiento 371
14.3 Estudio de pacientes 376
Posibilidades para un diagnostico prenatal 376
Posibilidades actuales de tratamiento 377
Posibilidades de la terapia génica 379
Posibilidades de la terapia celular 381
14.4 Resumen y ampliación 381
Terapia génica 381
Terapia con células madre 382
Diagnóstico y consejo 383

Análisis 384
Tratamiento 384

14.5 Referencias 391

14.6 Ejercicios de autoevaluación 392

Guía de los ejercicios de autoevaluación

Capítulo 1 393
Capítulo 2 393
Capítulo 3 394
Capítulo 4 394
Capítulo 5 394
Capítulo 6 394
Capítulo 7 395
Capítulo 8 395
Capítulo 9 396
Capítulo 10 396
Capítulo 11 397
Capítulo 12 397
Capítulo 13 398
Capítulo 14 399

Glosario 401

Índice alfabético 413

Historias clínicas. Resumen de los casos y páginas de referencia

CASO 1 Familia Ashton — 1, 7, 65, 104, 150, 376

- John, 28 años, hijo mayor de Alfred Ashton
- ? Enfermedad de Huntington
- Otros miembros de la familia con síntomas similares
- El árbol genealógico muestra una herencia autosómica dominante
- Solicitado análisis diagnóstico – *Capítulo 1*

CASO 2 Familia Brown — 2, 8, 65, 126, 151, 279, 376

- Niña de seis meses (Joanne), hija de David y Pauline
- ? Fibrosis quística
- ¿Solicitar análisis molecular? – *Capítulo 1*
- Definir mutaciones del gen *CFTR* – *Capítulo 5*
- ¿Cribado universal de recién nacido? – *Capítulo 11*

CASO 3 Familia Choudhary — 3, 9, 66, 242, 260, 376

- Niña (Nasreen) de ocho meses, hija de Aadnan y Mumtaz
- Sorda
- Los padres son primos
- El árbol genealógico sugiere hipoacusia autosómica recesiva – *Capítulo 1*

CASO 4 Familia Davies 4 10 66 102 151 181 279 376

- Niño (Martin) de 24 meses, hijo de Judith y Robert
- Torpe y lento al caminar
- Historia familiar de distrofia muscular
- El árbol genealógico sugiere herencia ligada al X recesiva
- Solicitar análisis diagnóstico de ADN – *Capítulo 1*
- Mutación por cambio de patrón de lectura en el gen de la distrofina. – *Capítulo 6*
- ¿Cribado de todos los niños recién nacidos? – *Capítulo 11*

CASO 5 Familia Elliot 4 11 42 64 376

- Aborto
- Bebé dismórfico muy pequeño (Elizabeth), hijo de Elmer y Ellen
- Problemas cardíacos
- Extracción de sangre para estudio cromosómico
- Árbol genealógico sugerente de enfermedad autosómica dominante con penetrancia reducida – *Capítulo 1*
- Traslocación recíproca – *Capítulo 3*

CASO 6 Familia Fletcher 5 12 67 131 152 376

- Frank, 22 años, con visión borrosa progresiva
- Historia familiar de problemas visuales
- Árbol genealógico sugerente de herencia recesiva ligada al X
- ? LHON
- Solicitar análisis para buscar una mutación en el ADN mitocondrial – *Capítulo 1*
- Se buscan mutaciones por pirosecuenciación – *Capítulo 5*
- Mutación G3460 en el ADNmt – *Capítulo 6*

CASO 7 Familia Green 25 38 68 99 376

- Niña (Gillian) de 3 años
- Retraso del desarrollo
- ? Anomalía cromosómica
- Realizar test para analizar la microdeleción 22q11 – *Capítulo 2*

CASO 8 Familia Howard 26 38 68 100 275 376

- Helen hija recién nacida de Henry y Anne (33 años)
- Síndrome de Down
- ¿Riesgo de recurrencia si tienen más niños? – *Capítulo 2*

CASO 9 Familia Ingram 26 41 68 102 182 376

- Isabel, primera hija de Ian e Irene
- Talla baja a pesar de la altura de los padres
- ? Síndrome de Turner – *Capítulo 2*
- Diagnóstico confirmado mediante cariotipo – *Capítulo 7*

CASO 10 Familia Johnson 55 64 376

- Síndrome de Marfan – *Capítulo 3*

CASO 11 Familia Kavanagh 81 97 152

- Primer hijo sano
- Segundo hijo, Celia, pálida con niveles de hemoglobina bajos
- Anemia falciforme – *Capítulo 4*
- Mutación de un único nucleótido, Glu→Val – *Capítulo 6*

CASO 12 Familia Lawton 82 98 376

- Historia familiar de hemofilia
- Lactante varón, Lennox, con cefalohematoma – *Capítulo 4*

CASO 13 Familia Murphy 83 100 376

- Lactante femenino, Michelle, con rasgos dismórficos
- ? Anomalía cromosómica desbalanceada – *Capítulo 4*

CASO 14 Familia Nicolaides 115 129 153 376

- ? Portadores de ß-talasemia
- Búsqueda de mutaciones – *Capítulo 5*
- Mutación sin sentido p.Gln39X en Spiros
- Mutación de Elena c.316-106>G – *Capítulo 6*

CASO 15 Familia O'Reilly 141 154 376

- Historia familiar de miopía y problemas de cadera
- Orla tiene miopía severa, es baja y tiene problemas
- ? Síndrome de Stickler
- Mutación por cambio de patrón de lectura en *COL2A1* – *Capítulo 6*

CASO 16 Familia Portillo 173 183 214 376

- Pablo, niño enfermizo
- Historia familiar con síntomas similares
- Los análisis sanguíneos sugieren inmunodeficiencia combinada ligada al X – *Capítulo 7*
- Comprobar que el trasplante de médula ósea es apropiado – *Capítulo 8*

CASO 17 Familia Qian 174 185 376

- Kai, niña, 2 años, tiene retraso del desarrollo
- Convulsiones
- ? Síndrome de Angelman
- Comprobar la mutación por FISH – *Capítulo 7*

CASO 18 Familia Rogers 175 185 376

- Bebé niño, Robert, nacido de padres mayores
- Hipotonía al nacer; incapaz de mamar
- El análisis genético durante el embarazo mostraba un cariotipo masculino normal
- ? Síndrome de Prader-Willi
- Comprobar por PCR la mutación causativa – *Capítulo 7*

CASO 19 Familia Stott 199 210 376

- Segundo embarazo; la ecografía sugiere un varón
- Bebé nacido con genitales ambiguos
- FISH para cromosomas
- ? Hiperplasia adrenal congénita
- PCR para buscar mutaciones – *Capítulo 8*

CASO 20 Familia Tierney 200 213 310 376

- Jason, niño de 4 años
- Pálido con hematomas extensos y taquicardia
- ? Leucemia aguda linfoblástica
- Análisis de médula ósea y comprobación del diagnóstico
- Análisis enzimático de TPMT previo al tratamiento con 6-mercaptopurina – *Capítulo 8*

CASO 21 Familia Ulmer 251 259 281 376

- Hannah, bebé de 6 meses
- Origen judío ashkenazi
- Enfermedad de Tay-Sachs
- ¿Analizar los hermanos? – *Capítulo 10*
- ¿Cribado para la enfermedad de Tay-Sachs? – *Capítulo 11*

CASO 22 Familia Vlasi 271 276 376

- Valon, niño de 6 años
- Problemas graves de aprendizaje
- Pequeño, microcefálico, ojos azules, piel y pelo claros, eczema; hiperactivo
- ? Fenilcetonuria
- ¿Test para el siguiente niño? – *Capítulo 11*

CASO 23 Familia Wilson 293 311 376

- ? Cáncer de mama familiar
- Análisis de la mutación en el ADN – *Capítulo 12*

CASO 24 Familia Xenakis 294 315 376

- Historia familiar de problemas intestinales
- ? FAP – *Capítulo 12*

CASO 25 Familia Yamamoto 329 341 376

- Historia familiar de demencia
- ? Enfermedad de Alzheimer
- ¿Análisis para ApoE4? – *Capítulo 13*

CASO 26 Familia Zuabi 330 345 376

- Zafira, mujer de 52 años
- Sobrepeso; estilo de vida sedentario; sed insaciable
- Diabetes tipo 2
- Análisis para su hijo – *Capítulo 13*

Abreviaturas

ACTH	hormona adrenocorticotropa
ADN	ácido deoxirribonucleico
AFP	alfa-fetoproteína
ALAS	ácido aminolevulínico sintetasa
APP	precursor de la proteína amiloide
ARN	ácido ribonucleico
ASO	oligonucleótido específico de alelo
ASP	parejas de hermanos afectos
CAH	hiperplasia adrenal congénita
CDK	quinasa dependiente de ciclina
CGH	hibridación genómica comparativa
cM	centiMorgan
dHPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento parcialmente desnaturalizante
DMD	distrofia muscular de Duchenne
DSH	discromatosis simétrica hereditaria
DTDST	distrofia diastrófica transportadora de sulfato
DZ	dicigótico
FAP	poliposis adenomatosa familiar
FDA	Food and Drug Administration
FH	hipercolesterolemia familiar
FISH	hibridación *in situ* fluorescente
FIV	fecundación *in vitro*
GvH	injerto-versus-huésped
HLA	antígeno humano leucocitario
HNPCC	cáncer de colon hereditario no-polipósico
Ig	inmunoglobulinas
IRT	tripsina inmunorreactiva
LDL	lipoproteína de baja densidad
LHON	neuropatía óptica hereditaria de Leber
LLA	leucemia linfocítica aguda
MCAD	cadena media de la acil-CoA deshidrogenada
MH	hipertermia maligna
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
ML	mucolipidosis
MLPA	amplificación múltiplex dependiente de ligación
MMR	reparación de apareamiento erróneo
MODY	diabetes de comienzo adulto en los jóvenes
MSAFP	alfa-fetoproteína en suero materno
MZ	monocigótico
NK	natural killer
NSC	National Screening Committee

NTD	defecto de tubo neural
OLA	análisis de ligamiento de oligonucleótidos
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PKU	fenilcetonuria
PWS	síndrome de Prader–Willi
QTL	loci de rasgos cuantitativos
RB	retinoblastoma
RFLP	polimorfismo de tamaño de fragmento de restricción
RSTS	síndrome de Rubinstein–Taybi
SNP	polimorfismo de un único nucleótido
SSCP	polimorfismo de conformación de cadena simple
SUMF	factor modificante de sulfatasas
T2D	diabetes tipo 2
TDT	test de transmisión en desequilibrio
TGFb	factor transformante de crecimiento b
TPMT	tiopurina metil transferasa
TS	supresor de tumores
UPD	disomía uniparental
X-SCID	inmunodeficiencia combinada grave ligada al X

Prólogo

Este libro es el resultado de la colaboración entre un científico (Andrew Read) y un clínico (Dian Donnai). Consecuentemente, representa la forma en la que la genética clínica funciona. Hemos sido afortunados de trabajar en una unidad integral de genética en la que los clínicos, los consejeros genéticos, los científicos implicados en el diagnóstico y los investigadores trabajan unidos. Cuando llegamos al Departamento de Genética médica del St. Mary's Hospital de Manchester en 1977, nos asignaron mesas contiguas en un pasillo: el departamento se había quedado pequeño. Ambos estábamos allí porque creíamos que esa era el área más excitante y dinámica de la Biología y de la Medicina. Los años siguientes demostraron que era cierto este pensamiento.

Nuestro primer público son los estudiantes, pero creemos que también será útil para los consejeros genéticos y para los científicos y, por supuesto, para los clínicos, que buscan una introducción al campo de la Genética clínica en Medicina y Biología. Solo unos pocos de los estudiantes actuales de Medicina se especializarán en Genética. Sin embargo, todos necesitan entender los principios de Genética y su aplicación, ya que, en el futuro, los conocimientos de genética sustentarán la mayor parte de la práctica médica. Hemos intentado hacer un libro que haga el aprendizaje interesante centrándonos en pacientes y en situaciones clínicas reales, sin perder de vista la estructura conceptual de la genética. Como se explica en la sección *Cómo utilizar este libro*, hemos diseñado el libro de forma que pueda utilizarse en un curso basado en casos clínicos o de una forma más tradicional enfocada a la ciencia.

Hemos basado el contenido del libro en el currículo de la American Society of Human Genetics y en la *Lista de competencias* para los estudiantes de medicina que se utiliza en el NHS Genetics Education Centre de Gran Bretaña. Las versiones con anotaciones de ambos documentos, que citan los lugares principales de este libro donde se puede encontrar el material relevante, están disponibles en http://www.scionpublishing.com/newclinicalgenetics.

Estamos agradecidos a David Cooper, Susan Hamilton, Lauren Kerzin-Storrar, Helen Middleton-Price, Rehat Perveen y Alison Stewart, que han leído varias secciones y han hecho sugerencias. Además, Susan Hamilton ha proporcionado la mayoría de las fotografías de citogenética. También queremos agradecer a todos los colegas a los que hemos pedido fotografías o datos, por su amabilidad y paciencia, y a las familias que generosamente han cedido sus fotografías. Esperamos haber identificado las fuentes de todas las ilustraciones, pero si alguien observa que una figura o fotografía se ha usado sin el debido reconocimiento, agradeceremos que nos lo digan. Finalmente, queremos dar las gracias a Jonathan Ray de Scion Publishing Ltd. por sus buenas ideas, su trabajo y su inagotable paciencia, sin los cuales este libro no se habría hecho realidad.

Andrew Read y Dian Donnai

Cómo utilizar el libro

Cada capítulo plantea una pregunta específica que los estudiantes tienen sobre Genética. Por ejemplo ¿cómo podemos estudiar los cromosomas?, ¿es genético el cáncer?, etc. Los capítulos siguen una estructura común:

- *Conceptos y habilidades*. Resumen de lo que el estudiante debe de aprender en el capítulo. Se han elegido para completar el currículo publicado por la American Society of Human Genetics y la lista de competencias que ha desarrollado el NHS Genetics Education Centre de Gran Bretaña.
- *Historias clínicas*. Todos los capítulos, excepto el último, contienen esta sección, que presenta una serie de descripciones clínicas cortas de una familia y las razones por las que deben de ser aconsejadas genéticamente o deben de someterse a pruebas genéticas. Todos los casos y las fotografías que ilustran la enfermedad que los pacientes describen son ficticios, pero están basadas en nuestra larga experiencia con familias reales.
- *Antecedentes*. Explicación de los métodos y de los conceptos que se necesitan en ese capítulo.
- *Estudio de pacientes*. Utiliza los casos clínicos para demostrar las aplicaciones de los métodos y de los conceptos en situaciones reales. De esta forma se desarrollan historias que discurren a lo largo de varios capítulos.
- *Resumen y ampliación*. Resume y amplía los conocimientos científicos relevantes.

Los estudiantes pueden elegir diferentes caminos con estos materiales:

CASO 1 Familia Ashton **1** 7 65 104 150 376

- John, 28 años, hijo mayor de Alfred Ashton
- ? Enfermedad de Huntington
- Otros miembros de la familia con síntomas similares
- El árbol genealógico muestra una autosómica dominante
- Solicitado análisis diagnóstico

- Los que prefieran un enfoque basado en un problema deberían concentrarse en las secciones *Historias clínicas* y *Estudio de pacientes* de cada capítulo, y manejar el resto de las secciones como material de referencia. Se incluyen páginas de referencia para facilitar a los estudiantes el seguimiento de los casos a lo largo del libro. Por ejemplo, la familia Ashton se trata en las páginas 1, 7, 65, 104, 150 y 376. Además, los "puntos" asociados a cada caso, sirven de recordatorio de lo que se ha descrito previamente.

- Los que prefieran un acercamiento más didáctico deben concentrarse en los aspectos científicos descritos en las secciones *Antecedentes* y *Resumen y ampliación*. Las otras secciones suministran ejemplos e ilustraciones.

Los capítulos finalizan con una sección de autoevaluación en la que los estudiantes pueden comprobar si han asimilado la materia.

Este libro no es un manual de diagnóstico por lo que no describe las principales enfermedades mendelianas o cromosómicas. Sin embargo, los casos y los *Cuadros de enfermedad* ayudan a demostrar el rango y la variedad de las enfermedades genéticas. Para una información específica deben de dirigirse a las páginas web que se citan en la sección *Referencias*. El primer sitio a visitar debe de ser la base de datos OMIM: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim – los números de referencia OMIM aparecen a lo largo de todo el libro.

Capítulo **1**

¿Qué podemos aprender de la historia familiar?

Conceptos y habilidades que aprenderá en este capítulo

Después de estudiar este capítulo será capaz de:

- Hacer una historia familiar.
- Dibujar un árbol genealógico utilizando los símbolos correctos.
- Identificar el modo de herencia más probable, dado un sencillo árbol genealógico.
- Describir si la segregación de los genes es autosómica dominante, autosómica recesiva, ligada al X dominante, ligada al X recesiva, ligada al Y o mitocondrial.
- Definir penetrancia y expresividad.
- Realizar apreciaciones sobre los datos humanos y científicos suscitados por las enfermedades descritas.

1.1. Historias clínicas

CASO 1	Familia Ashton	1	7	65	104	150	376

- John, 28 años, hijo mayor de Alfred Ashton
- ? Enfermedad de Huntington
- Otros miembros de la familia con síntomas similares

Alfred Ashton, de 52 años, se estaba volviendo olvidadizo y pensaba que estaba deprimido tras haber perdido su trabajo. Ha estado visitando a un psiquiatra, que ha notado que Alfred estaba inquieto y tenía algunos movimientos coreiformes (movimientos espasmódicos involuntarios de sus dedos y hombros, y muecas faciales). Alfred le contó al psiquiatra que pensaba que podía estar desarrollando "la enfermedad de la familia", aunque no sabía mucho acerca de ella. El psiquiatra sospechó que Alfred tenía la enfermedad de Huntington (OMIM 143100). Su hijo John ha sido dirigido a la consulta genética por su médico de familia a sugerencia del psiquiatra. Jonh no sabe nada de la enfermedad de Huntington; está preocupado por otras cosas, se acaba de casar y ha comprado una casa.



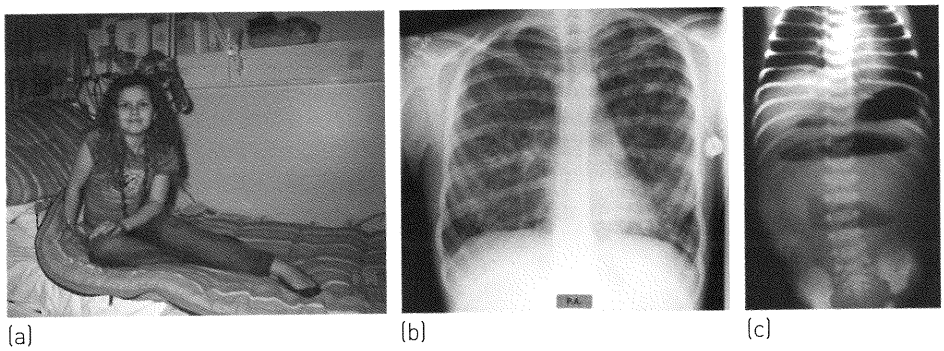
(a) (b)

Figura 1.1 – Enfermedad de Huntington.
[a] Un paciente en un estadio avanzado de la enfermedad mostrando movimientos involuntarios de la cabeza y de la cara. Fotos cortesía del Profesor Peter Harper, Cardiff. [b] Preparaciones post-mortem comparando un cerebro normal (izquierda) con uno con la enfermedad de Huntington (derecha); nota la pérdida de tejido en este último. Fotos cortesía de Dr. David Crauford, Hospital St. Mary's, Manchester.

CASO 2 | Familia Brown | **2** | 8 | 65 | 126 | 151 | 279 | 376

- Niña de seis meses (Joanne), hija de David y Pauline
- ? Fibrosis quística

Joanne es la segunda hija de David y Pauline Brown. Su hermano mayor, Jason, tiene ahora 4 años y está muy sano, de hecho sus padres tienen que comprar ropa para él de la talla de 6 años. Joanne, sin embargo, es otra cosa. Ha preocupado a sus padres desde el principio. Aunque tomaba bien sus biberones, ganaba peso muy lentamente y en sus primeros meses parecía que constantemente estaba resfriada y tenía tos. Al principio Pauline y el doctor no le dieron importancia, ya que Jason acababa de empezar a ir a la guardería y había tenido algunos resfriados. Cuando Joanne tenía 5 meses estaba muy enferma e ingresó en el hospital con una infección en el pecho. Las enfermeras comentaron que su intestino estaba muy abultado y su peso y altura estaban en percentiles más bajos que cuando nació o en su primer mes de vida. Los médicos sospecharon que podía padecer fibrosis quística (OMIM 219700) y, por lo tanto, pidieron un test del sudor. Esto confirmó su sospecha (nivel de Na^+ 87 mmol/litro, bastante por encima del nivel superior de 60 mmol/l). La noticia cayó como una bomba a Pauline y David. A petición propia, el pediatra de Joanne les derivó a un genetista para comentar su enfermedad.



(a) (b) (c)

Figura 1.2 – Fibrosis quística.
[a] Las perspectivas para los pacientes de fibrosis quística han mejorado con los años, pero todavía necesitan frecuentes visitas al hospital, fisioterapia y medicación constante. [b] Radiografía torácica de los pulmones de un paciente con fibrosis quística. [c] Placa abdominal de un recién nacido erguido con íleo meconial con niveles elevados de líquidos. Fotos [a] y [b] cortesía del Dr. Tim David, Hospital Infantil Royal Manchester.

Cuadro 1.1

Efectos pleiotrópicos* de la fibrosis quística

• **Pulmón**	Mucosidad anormal que provoca infección y daño
• **Tracto gastrointestinal**	Íleo meconial Obstrucción del intestino distal Prolapso rectal
• **Páncreas**	Disfunción del páncreas exocrino Malabsorción
• **Tracto hepatobiliar**	Cirrosis biliar Cálculo biliar
• **Glándulas sudoríparas**	Niveles de cloruro y sodio elevados en sudor
• **Tracto reproductivo**	Ausencia biliar congénita de vasos deferentes (CBAVD) Secreciones cervicales espesas

*Pleiotrópico = que tiene muchos efectos.

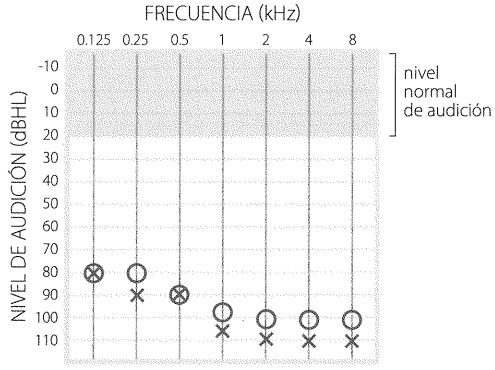
CASO 3 | Familia Choudhary | **3** | 9 | 66 | 242 | 260 | 376

- Niña (Nasreen) de ocho meses, hija de Aadnan y Mumtaz
- Sorda
- Los padres son primos

Nasreen es la primera hija de una joven pareja (Aadnan y Mumtaz Choudhary) que son primos hermanos. El embarazo y el nacimiento fueron normales y Nasreen se desarrolló normalmente. Ella sonreía, levantaba la cabeza y miraba alrededor siguiendo un calendario normal. Siguió las consultas rutinarias pediátricas. Cuando a sus ocho meses le hicieron un test de audición, no parecía reaccionar normalmente al sonido. Su madre esperaba que fuera porque estaba soñolienta, pero sus audiogramas mostraron que tenía una pérdida bilateral de audición profunda.



(a)



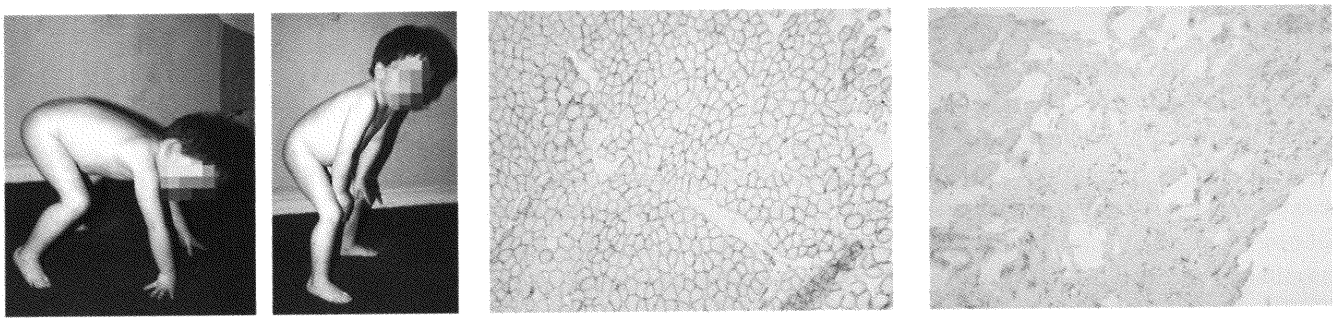
(b)

Figura 1.3 – Resultado del test de audición.
[a] Realización del test de audición de un bebé comprobando la respuesta auditiva del cerebro. [b] Audiograma que muestra una pérdida bilateral grave y profunda de audición. El eje horizontal muestra la frecuencia y el eje vertical el umbral de audición en decibelios. Se utilizan diferentes símbolos para las lecturas de los dos oídos. 0-20dB es audición normal; la pérdida de audición se define como 20-40 dB (ligera), 40-70 dB (moderada), 70-95dB (severa) y más de 95 dB (profunda).

CASO 4 | Familia Davies | **4** | 10 | 66 | 102 | 151 | 181 | 279 | 376

- Niño (Martin) de 24 meses, hijo de Judith y Robert
- Torpe y lento al caminar
- Historia familiar de distrofia muscular

Martin es el primer hijo de Judith y Robert Davies; tienen también dos hijas, Leanne y Kathryn. Las niñas fueron muy rápidas en la adquisición de sus hitos motores y ambas caminaban antes de su primer cumpleaños. Martin parecía más lento en muchos aspectos y su madre pensaba que esto era porque era un chico. Sin embargo, dado que cuando el niño tenía 18 meses todavía no andaba, fueron a consultar al médico. El médico no encontró nada cuando examinó al niño y lo citó seis meses más tarde para una nueva visita. Mientras tanto, Martin dio sus primeros pasos a los 20 meses, pero el doctor, en la siguiente cita, notó que Martin estaba muy torpe y cuando se levantaba del suelo tenía que agarrarse a una silla o impulsarse poniendo sus manos sobre sus piernas. Tanto el doctor como Judith estaban muy preocupados porque conocían la historia familiar de distrofia muscular y, aunque existen muchas razones por las que un niño pequeño puede ser lento y torpe caminando, también pueden ser signos tempranos de la enfermedad. Ambos estuvieron de acuerdo en que Martin necesitaba ser referido a un neurólogo y Judith y Robert necesitaban ver a un genetista.



(a) (b) (c)

Figura 1.4 – Distrofia muscular de Duchenne.
[a] Niños afectos levantándose apoyando sus brazos contra sus piernas (maniobra de Gower) porque los músculos proximales de sus piernas están débiles. [b] y [c] Histología muscular (tinción Gomori tricrómica). El músculo normal [b] muestra una arquitectura regular de las células, con distrofina (tinción marrón) en todas las membranas externas. [c] Muestra el músculo de un niño afecto de 10 años. Note la desorganización, la invasión por tejido fibroso y la completa ausencia de distrofina. Fotos histológicas cortesía del Dr. Richard Charlton, Newcastle upon Tyne.

CASO 5 | Familia Elliot | **4** | 11 | 42 | 64 | 376

- Aborto
- Bebé dismórfico muy pequeño (Elizabeth), hijo de Elmer y Ellen
- Problemas cardíacos

Elmer y Ellen decidieron que querían formar una familia tan pronto como volvieran de su luna de miel en Jamaica, donde habían nacido los padres de Elmer. No mucho tiempo después, Ellen quedó embarazada, pero 8 semanas después de su último periodo, empezó a sangrar y después de esto el test de embarazo fue negativo. El siguiente embarazo, 5 meses después, parecía ir bien al principio, pero a las 30 semanas de gestación la ecografía mostraba un bebé de tamaño pequeño. Esto

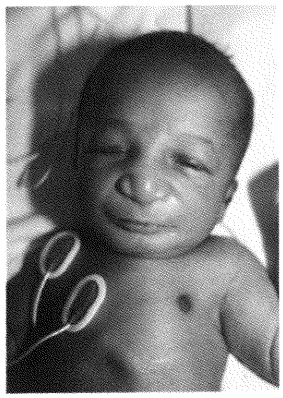


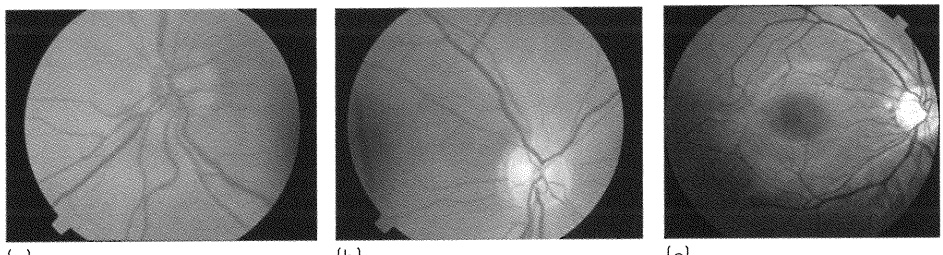
Figura 1.5 – Un bebé con múltiples anomalías congénitas y características dismórficas.

no preocupó a la pareja, ya que Ellen era bastante pequeña. Sin embargo, cuando Elizabeth nació a las 37 semanas de gestación, quedó claro que no estaba bien. Elizabeth era un bebé muy pequeño (su longitud y su peso estaban en el percentil 3), pero su perímetro craneal estaba significativamente por debajo del percentil 3. Necesitaba alimentación parenteral y parecía quedarse sin aliento muy fácilmente. Le detectaron un soplo en el corazón y un ecocardiograma mostró que tenía un defecto en el septo ventricular y un estrechamiento en su válvula aórtica. El pediatra pidió al genetista que viera a Elizabeth y a sus padres, y aconsejara qué estudios podrían ser de ayuda. Ellen contó al genetista que su hermana había tenido dos abortos tempranos y su tía, que vive en Trinidad, tuvo un niño que murió con un defecto congénito en el corazón y un niño muerto antes de tener dos niños sanos.

CASO 6 — Familia Fletcher — 5 | 12 | 67 | 131 | 152 | 376

- Frank, 22 años, con visión borrosa progresiva
- Historia familiar de problemas visuales

Frank era un electricista que, a sus 22 años, acababa de terminar su formación académica. Disfrutaba saliendo con sus amigos y tendía a beber bastante alcohol los fines de semana. Siempre había tenido buena vista, pero un día notó que su visión era borrosa y los colores de los cables con los que trabajaba parecían más pálidos que de costumbre. Como no mejoraba fue a ver al óptico. Este percibió cambios en su retina y le envió con carácter urgente al hospital oftalmológico. Allí encontraron que tenía hinchazón del disco ocular (pseudoedema de la capa del nervio) y un incremento de la tortuosidad de los vasos de la retina. Gradualmente, a largo de los meses siguientes, su visión empeoró mucho y tuvo que dejar su trabajo. Su madre, Freda, era una mujer saludable pero su único hermano estaba ciego desde los 28 años, según recordaba ella, por una atrofia óptica. Su hermana Doreen también tiene graves deficiencias visuales que comenzaron alrededor de los 45 años. El oftalmólogo recomienda a Frank asistir a una consulta genética debido a su historia familiar.



(a) (b) (c)

Figura 1.6 – **Neuropatía óptica hereditaria de Leber.**
[a] Disco óptico 3 semanas después de notar la reducción visual; nota la hiperemia del disco con márgenes borrosos. [b] Retina de la tía; pérdida de visión varios años antes. Note la palidez del disco, fundamentalmente temporal, de la atrofia óptica. [c] Retina normal. Fotos cortesía de Mr. Graeme Black, St. Mary's Hospital, Manchester.

1.2. **Antecendentes**

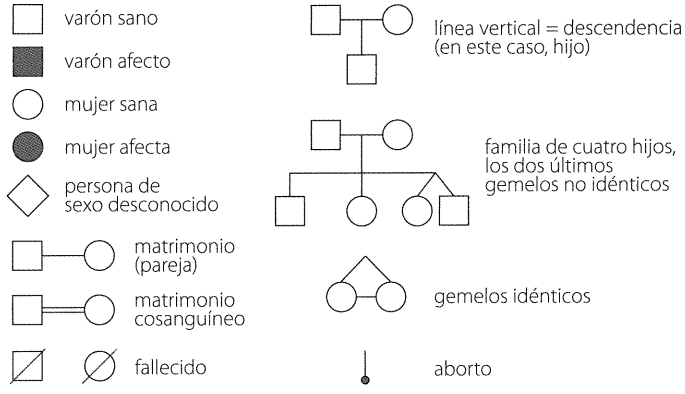
Lo primero que hay que hacer con estos pacientes es su historia familiar. Aun cuando los informes de interconsulta den lugar a la historia familiar, es importante para el genetista abordarla cuidadosamente, siguiendo el protocolo del *Cuadro 1.2*. La historia familiar puede dar claves para el diagnóstico genético; también nos da información importante para el diagnóstico y el consejo genético.

Cuadro 1.2

Cómo hacer la historia familiar y dibujar un árbol genealógico

Tome un árbol genealógico prediseñado o un papel en blanco y trace cuatro líneas con el papel apaisado. Comience con el **consultante** (la persona referida para la consulta) en el medio, en la zona más próxima a la parte inferior. Dibuje el signo correcto (ver debajo) y escriba su nombre, fecha de nacimiento y las características clínicas relevantes. Después añada los datos de su cónyuge/s o pareja/s. Posteriormente los de sus hijos, padres y hermanos. También las parejas e hijos de sus hermanos. A continuación, pregunte por los padres, sus parejas e hijos. Finalmente, incorpore a los abuelos y a sus hermanos. A no ser que exista alguna razón para hacerlo, no es necesario ir más allá de los abuelos. Sea cuidadoso preguntando sistemáticamente sobre cada persona, su nombre, fecha de nacimiento, si ha muerto, cuál ha sido la causa y cualquier información clínica relevante. Investigue sobre abortos o problemas reproductivos y, si es apropiado, el lugar de origen de cada persona. Incluso aunque el consultante esté convencido de que conoce cuál es la rama de la familia portadora de la enfermedad, es importante recolectar todos los detalles de ambas ramas (las creencias familiares pueden ser muy engañosas). Algunas instituciones utilizan sistemas informatizados; mediante una batería de preguntas, el sistema dibuja el árbol genealógico por usted.

Construya el árbol genealógico, poniendo cada generación en una línea horizontal. Los hermanos deben aparecer ordenados por su fecha de nacimiento. Si el árbol genealógico es muy complicado probablemente tendrá que rehacerlo posteriormente. Puede utilizar los de este capítulo como modelo. Los símbolos apropiados a utilizar son:



1.3. **Estudio de pacientes**

En cada uno de nuestros casos la investigación principal consistía en construir un árbol genealógico detallado. Los árboles genealógicos siguientes ilustran algunas de las características típicas autosómicas dominantes (enfermedad de Huntington), autosómicas recesivas (fibrosis quística y la sordera de Nasreen) y de enfermedades recesivas ligadas al X (la distrofia muscular de Martin). Los dos últimos árboles genealógicos (los de las familias Elliot y Fetcher) requieren una interpretación que será considerada al final de este capítulo.

- John, 28 años, hijo de Alfred Ashton
- ? Enfermedad de Huntington
- Otros miembros de la familia con síntomas similares
- Árbol genealógico muestra herencia autosómica recesiva
- Solicitado análisis diagnóstico

La madre de John vino a la clínica con él para ayudar en la realización del árbol familiar. Además de John, ella tiene una hija con dos niños. El abuelo paterno de John, Frederick (padre de Alfred Ashton), murió en un accidente industrial con 38 años, su abuela materna vive y está sana con 77 años. La abuela paterna de Alfred Ashton se demenció en la cincuentena y necesitó cuidados institucionales. Lo mismo le sucedió a uno de sus dos hermanos y a su única hermana. Aunque la familia ha perdido contacto con los parientes lejanos, desde que diagnosticaron al padre de John, han oído que otras personas de la familia tienen la enfermedad de Huntington. Están muy preocupados por la hermana de Alfred que vive en Australia y que tiene movimientos espasmódicos como su hermano.

Este árbol genealógico muestra herencia autosómica dominante. Los niños de una persona afectada por enfermedad de Huntington tienen una posibilidad de cada dos de heredar el gen de la enfermedad de Huntington. Si ellos heredan el gen, inevitablemente desarrollarán la enfermedad a menos que mueran antes, como el padre de Alfred. La enfermedad puede desarrollarse a cualquier edad desde la infancia hasta más de 70 años, pero la mayoría la desarrollan en la cuarentena.

Enfermedades genéticas severas de comienzo tardío como la enfermedad de Huntington causan dilemas cruciales en las personas en riesgo. John acaba de casarse y comprar una casa. Su mujer y él están pensando en formar una familia. Aunque él no muestra síntomas, si es portador del gen de Huntington, inevitablemente desarrollará la enfermedad en algún momento de su vida y cualquier niño que tenga, tiene una posibilidad de cada dos de heredarla. Un análisis de ADN puede dilucidar si John es portador o no de la mutación. Decidir si hacer o no el análisis de ADN será una de las decisiones más duras de su vida. En el Reino Unido alre-

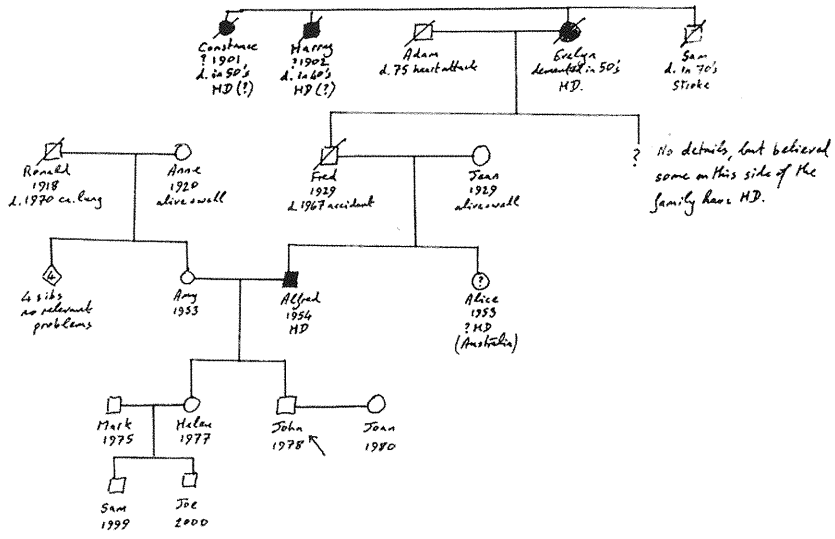


Figura 1.7 – Árbol genealógico de la familia Ashton.
Así es como el árbol familiar estaba recogido en la consulta pero, como los casos y familias de este libro son ficticios, todos los árboles siguientes muestran sólo información que es relevante para seguir el caso y entender la genética.

dedor del 70% de las personas en esta situación optan, tras un consejo genético, por no hacer el test. Los asesores genéticos siempre deben respetar a los pacientes que no quieren saber, en esta o en otra situación, si esa es su elección. Tras embarcarse en este proceso, es crucial confirmar que la enfermedad de la familia es realmente enfermedad de Huntington y no otras enfermedades neurodegenerativas no relacionadas o una enfermedad rara dominante que parece Huntington. En este caso el psiquiatra confía en el diagnóstico de Alfred, pero se realiza el análisis de ADN para confirmarlo (ver *Capítulo* 4 para la descripción). Realizar un análisis de ADN en alguien que está enfermo constituye un **test diagnóstico** que no es tan sensible éticamente como un **test predictivo** en una persona sana como John, aunque un análisis positivo en Alfred puede confirmar el peor pronóstico.

CASO 2 | Familia Brown | 2 | **8** | 65 | 126 | 151 | 279 | 376

- Niña de seis meses (Joanne), hija de David y Pauline
- ? Fibrosis quística
- ¿Solicitar análisis molecular?

El árbol genealógico muestra que no existe una historia familiar de fibrosis quística u otros problemas genéticos evidentes. "¿Cómo puede ser de origen genético, cuando nadie en nuestras familias la ha padecido?", preguntó Pauline. En efecto, este árbol es el típico de una enfermedad autonómica recesiva, presente en sociedades donde la consanguinidad no es frecuente. El niño afecto suele ser el único caso nacido de una pareja no consanguínea con una historia familiar nada relevante. De manera que el árbol genealógico no nos da la pista de enfermedad genética. La identificación de la causa suele comenzar haciendo el diagnóstico clínico. En ocasiones la enfermedad es tan inconfundible, y la genética tan poco ambigua, que el diagnóstico clínico proporciona un grado adecuado de certeza. Pero más a menudo, el diagnóstico clínico es solo una hipótesis, más o menos plausible. Lo ideal será realizar una prueba molecular que confirme la mutación.

En la mayoría de los casos de fibrosis quística, la historia clínica y un test de sudor positivo (mostrando el aumento característico de sodio) bastan. Genéticamente, la fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen *CFTR* del cromosoma 7 (ver en el *Capítulo* 3). Es necesario un análisis molecular para advertir a los familiares sobre su condición de portador, para el diagnóstico prenatal y para confirmar el diagnóstico en casos atípicos.

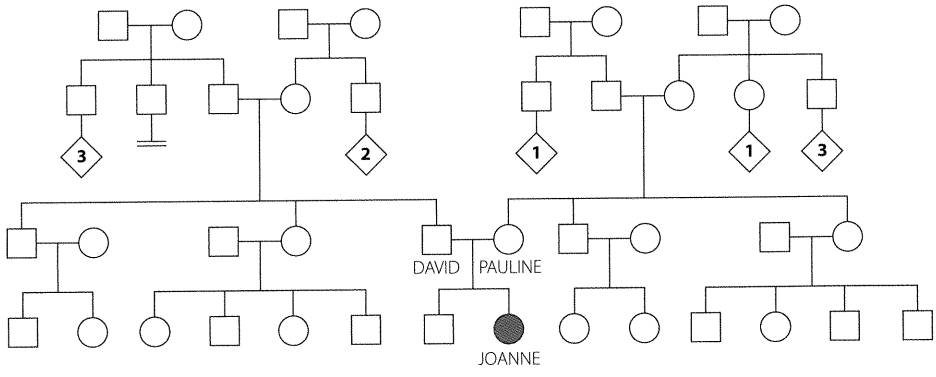


Figura 1.8 – Árbol genealógico de la familia de Joanne Brown.
Observe la ausencia de casos de fibrosis quística en la historia familiar. Las características autosómicas recesivas suelen aparecer como un único caso aislado.

- Niña (Nasreen) de ocho meses, hija de Aadnan y Mumtaz
- Sorda
- Los padres son primos hermanos
- El árbol genealógico sugiere sordera autosómica recesiva

La visita clínica se volvió un asunto familiar porque la hermana de Aadnan, Benazir, y el hermano de Mumtaz, Waleed, acudieron a la consulta junto con Aadnan, Mumtaz y Nasreen. Waleed es sordo, pero lee los labios y es capaz de participar en la consulta. El árbol genealógico muestra una gran familia con algunos matrimonios consanguíneos. En el Reino Unido estos árboles pertenecen en la mayoría de las ocasiones a personas originarias del Oriente Próximo o del subcontinente indio. Aadnan y Mumtaz son primos hermanos (ver *Cuadro 1.3*). Los padres de Mumtaz (que también son primos hermanos) tienen cuatro hijos además de Mumtaz. Dos varones, Waleed y Mohammed, son sordos y acudían al colegio para sordos, donde iban bien académicamente. Aadnan y Mumtaz quieren saber cuál es el riesgo de sordera para los niños que puedan tener en el futuro. Mumtaz ha tenido dos abortos y tiene miedo de no poder tener nunca niños sanos.

Las sorderas congénitas pueden ser debidas a factores ambientales como la rubéola en la madre o traumas de nacimiento. El genetista ha comprobado la historia de Mumtaz para estar seguro de que no existía evidencia de tales problemas, pero necesitaba hacer lo mismo con la madre de Mumtaz y su médico de familia para asegurarse de que no existieron factores ambientales en el caso de Waleed o Mohammed. El árbol genealógico muestra una sordera autosómica recesiva. Alrededor de dos tercios de las sorderas congénitas ocurren por esta causa. Si esta interpretación es correcta, cada futuro hijo de Aadnan y Mumtaz tiene un riesgo de 1 a 4 de ser sordo. La consanguinidad en la familia es otro punto a favor de la recesividad. Aunque el matrimonio consanguíneo aproximadamente duplica el riesgo de anomalías en los niños (dependiendo del grado de consaguinidad; ver *Capítulo 10*), el incremento es solo del 2% al 4%. En otras palabras, la posibilidad de tener un hijo sano se reduce solo del 98% al 96%. En muchas sociedades tradicionales existen razones sociales para casarse con un pariente mejor que con un extraño. Es muy improbable que los dos abortos de Mumtaz estén relacionados

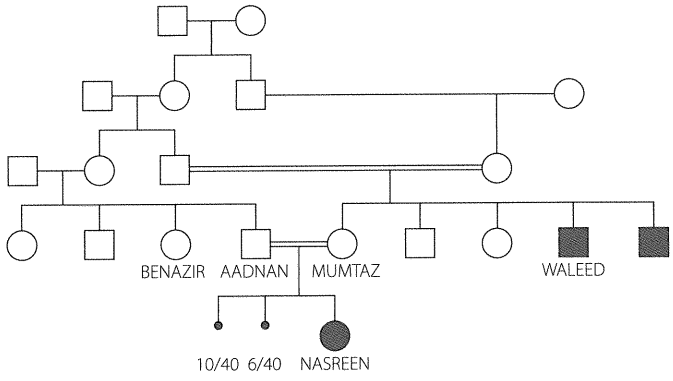


Figura 1.9 – Árbol genealógico de la familia de Nasreen Choudhary.
Observe las líneas dobles que se han utilizado para simbolizar los matrimonios consanguíneos. Se indican dos abortos tempranos. En un árbol real habría que escribir las fechas de nacimiento de los hermanos/as de Aadnan y Mumtaz, porque ordenarlos por orden de nacimiento puede dificultar el dibujo de un árbol genealógico claro.

con la sordera. Pueden existir evidencias de otras enfermedades recesivas más severas en la familia, pero existen múltiples causas no genéticas de aborto. El genetista tranquiliza a Mumtaz asegurándole que dos abortos tempranos es algo bastante común y no tiene un significado preocupante.

La presencia de Waleed y Benazir en la consulta se explica por su intención de contraer matrimonio. Benazir está preocupada por si sus descendientes pueden ser sordos, ya que Waleed y ella son primos hermanos. Waleed, sin embargo, tiene una visión mucho más relajada. El genetista tiene que ser sensible al problema y cuidadoso para no tratar de imponer su punto de vista. Los matrimonios consanguíneos dentro de una familia con una enfermedad recesiva conocida tienen riesgos específicos. En el *Capítulo 10* veremos cómo el genetista calcula el riesgo para Waleed y Benazir. Sin embargo, ese cálculo sólo sería válido si se confirma que la sordera de Waleed y Nasreen es autosómica recesiva. La familia tiene muchas ganas de saber si es posible que un análisis de ADN confirme la interpretación del problema. Esto se discutirá en el *Capítulo 3*.

Cuadro 1.3

Parentesco

Hermanos quiere decir hermanos y hermanas, independientemente del sexo.

Primos: Jack y Jill son **primos hermanos** si uno de los padres de Jack es hermano de uno de los de Jill. Son **primos segundos** si uno de los padres de Jack es primo hermano de uno de los de Jill.

En algunas culturas la palabra "primo" es utilizada libremente para decir "pariente". En terminología genética debemos utilizarla en el sentido estricto definido anteriormente. En parentescos más complejos como los de la **familia Choudhary** (**Caso 3**, *Figura 1.9*) es mejor definir los detalles del árbol genealógico dibujando o describiéndolos. Veremos en el *Capítulo 10* cómo calcular el grado exacto de parentesco y endogamia.

CASO 4 Familia Davies 4 **10** 66 102 151 181 279 376

- Martin, niño de 24 meses, hijo de Judith y Robert
- Torpe y lento al caminar
- Historia familiar de distrofia muscular
- El árbol genealógico muestra herencia recesiva ligada al X
- Solicitar análisis diagnóstico de ADN

El árbol genealógico muestra que la tía de Judith (hermana de su madre) tuvo dos hijos que murieron en la adolescencia por una enfermedad muscular progresiva. No había otros parientes afectos en la familia. El árbol genealógico es sugestivo de herencia recesiva ligada al X. Si Martin tiene el mismo problema que sus parientes fallecidos, entonces la herencia ligada al X es muy probable, pero en este momento todavía no existe esa certeza.

Es crucial conocer el diagnóstico exacto de estos dos chicos. Existen muchas enfermedades musculares degenerativas diferentes. Aunque el manejo del paciente es similar en todas estas enfermedades, es importante conocer el diagnóstico genético preciso para aconsejar a la familia. El genetista necesita recabar toda la información del caso, poniendo especial atención a los detalles del curso degenerativo de la enfermedad de los chicos y a los informes de la histología muscular. Debido al tiempo que hace que fallecieron es difícil realizar un análisis de ADN. Como se describe en el *Capítulo 4*, la realización de un análisis de ADN a Martin va a ser la parte central de la investigación.

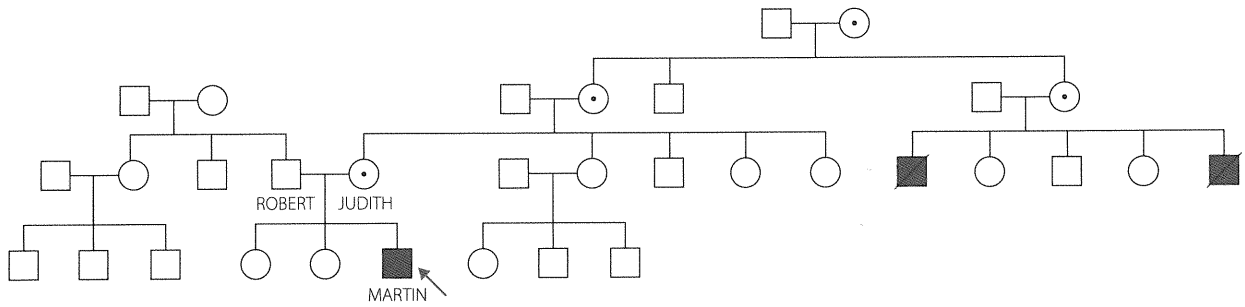


Figura 1.10 – Árbol genealógico de la familia de Martin Davies.
Asumiendo que la patología familiar es una distrofia muscular ligada al X, las mujeres marcadas con puntos son **portadoras obligatorias** del gen de la enfermedad, es decir, que ellas deben ser portadoras porque sus padres y su descendencia son afectos o portadores. Otras mujeres (como las hermanas de chicos afectos) pueden o no ser portadoras.

CASO 5 | Familia Elliot | 4 | **11** | 42 | 64 | 376

- Aborto
- Elizabeth, bebé dismórfico muy pequeño, hija de Elmer y Ellen
- Problemas cardíacos
- Extracción de sangre para estudio cromosómico
- Árbol genealógico sugerente de enfermedad autosómica dominante con penetrancia reducida

La historia familiar de abortos, mortinatos y niños nacidos vivos con malformaciones en varias generaciones, hace pensar en una enfermedad autosómica dominante con penetrancia reducida (ver en la *Sección 1.4* la explicación de penetrancia reducida). Sin embargo, la experiencia clínica sugiere como más probable una anomalía cromosómica estructural balanceada. El siguiente paso es realizar un estudio cromosómico en los padres y en los niños anormales vivos (ver *Capítulo 2*).

Tras el nacimiento de un niño con malformaciones u otros problemas, los padres experimentan un conjunto de emociones que incluyen shock, ansiedad, negación y confusión. Con frecuencia, experimentan también un sentimiento de pérdida del bebé sano que esperaban tener. Por supuesto, los demás miembros de la familia tienen sus propias respuestas ante la difícil situación y crecen las tensiones, particularmente si una "parte" culpa a la otra. El papel del equipo pediátrico al cuidado del bebé es mantener totalmente informada a la familia de sus hallazgos y sobre los análisis y estudios que estén llevando acabo. El papel del genetista clínico es ayudar a establecer un diagnóstico lo más pronto posible y comunicar los resultados a los padres de un modo comprensible para ellos y también lo que pueden esperar para el futuro de su hijo. El consejo genético sobre el riesgo de recurrencia y las implicaciones para el resto de la familia suelen ser tratados posteriormente, cuando los tratamientos clínicos urgentes se han llevado a cabo.

El genetista clínico y el pediatra están de acuerdo en que la explicación más probable a los problemas de Elizabeth es una anomalía cromosómica. Se realiza una extracción de sangre al bebé y a los padres para un estudio cromosómico. Los resultados y sus consecuencias se tratan en el *Capítulo 2*. Tras varias sesiones el genetista dibuja el árbol que se muestra más abajo. Los pobres resultados reproductivos (abortos o bebés anormales) en esta familia muestran un patrón autosómico dominante. Como se explica más abajo, esto no es incompatible con la sospecha de que los problemas estén causados por una anomalía cromosómica.

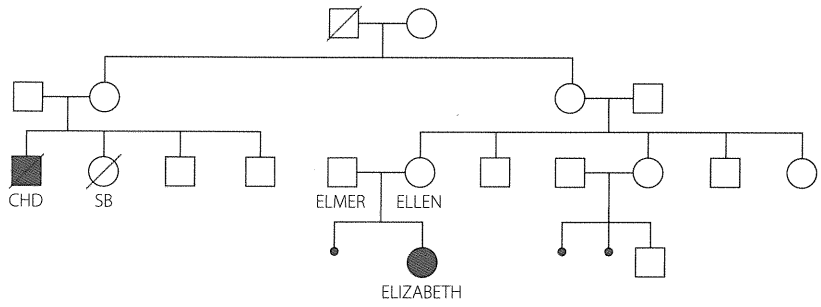


Figura 1.11 – Árbol genealógico de la familia Elliot.
Muestra la historia familiar de problemas reproductivos. SB significa nacido muerto (*stillbirth*) y CHD cardiopatía congénita (*congenital heart disease*).

CASO 6 | Familia Fletcher | 5 | **12** | 67 | 131 | 152 | 376

- Frank, 22 años, con visión borrosa progresiva
- Historia familiar de problemas visuales
- Árbol genealógico sugerente de herencia recesiva ligada al X
- ? LHON
- Solicitar análisis para buscar una mutación en el ADN mitocondrial

Frank acude a la consulta genética con su madre. Está todavía muy conmocionado por el diagnóstico y peor pronóstico que le ha expuesto el oftalmólogo. Todavía no ha empezado a aceptar los principales cambios que supone la enfermedad en su vida, incluyendo la pérdida de su trabajo y la imposibilidad de conducir. Sin embargo, ha empezado a pensar que, debido a su historia familiar, sus propios hijos pueden estar en riesgo. Cuando acude a la clínica está muy interesado en discutir este aspecto, sobre el que su novia y él están muy preocupados.

El genetista clínico dibuja un detallado árbol familiar con la ayuda de Freda, madre de Frank. Su hermano, Derek, es ciego y fue diagnosticado de una atrofia óptica. Tuvo sus primeros síntomas alrededor de los 20 años, como Frank; acudió a la escuela tras su diagnóstico y ahora trabaja para una gran compañía en su departamento de venta telefónica. También ha hablado con Frank sobre la organización nacional de personas con problemas visuales y la ayuda y consejos que ofrecen. La hermana de Freda, Doreen, no tuvo problemas hasta los 40 y su deterioro visual fue más lento, aunque su visión central está afectada. Ahora le han encontrado que tiene un ritmo cardíaco inusual y le ha pedido a Freda que averigüe si esto tiene algo que ver con sus problemas oculares.

Las siguientes pistas dirigen al genetista a formular una hipótesis sobre la enfermedad de la familia de Frank:

- la naturaleza de los problemas del ojo
- la rápida progresión de los síntomas en los hombres afectos
- el comienzo tardío y la levedad de la enfermedad en Doreen
- los problemas de ritmo cardíaco de Doreen

Basándose en estas observaciones, el genetista piensa que la enfermedad puede ser la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON). LHON (OMIM 535000) tiene un amplio rango de síntomas y edades de comienzo. Es debida a una mutación en el ADN mitocondrial (ADNmt, ver *Capítulo 3*). El genetista, por lo tanto, pide muestras de sangre de Frank y Freda. Si se confirma este tipo de herencia, son buenas noticias para los niños que Frank y su novia puedan tener, ya que los hombres no transmiten su ADNmt a sus hijos.

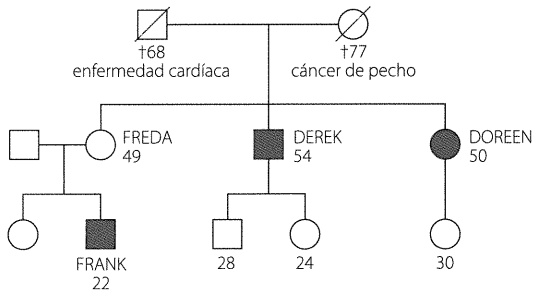


Figura 1.12 – Árbol genealógico de Frank Fletcher.
Este árbol familiar es difícil de interpretar. A primera vista el genetista pensó en una herencia recesiva ligada al X debido a que dos hombres afectados de manera similar están vinculados a través de una mujer normal. Sin embargo, Doreen también es afecta, lo que hace la herencia ligada al X menos probable. No obstante queda una posibilidad, ya que en ocasiones, en estas familias hay mujeres portadoras que manifiestan la enfermedad con síntomas más atenuados que en el caso de los hombres (ver *Capítulo 7*). Se deben tener en cuenta otros tipos de herencia como la herencia dominante ligada al X y la mitocondrial cuando las personas afectas están ligadas a través de la línea femenina.

1.4. Resumen y ampliación

El arte de la interpretación del árbol genealógico

En los animales de laboratorio, como la mosca de la fruta o el ratón, el modo de herencia de un rasgo siempre puede establecerse fuera de toda duda mediante experimentos de cruzamiento. Con los humanos tenemos que utilizar árboles genealógicos y rara vez son lo suficientemente extensos como para poder definir la herencia sin ambigüedad.

Con fines científicos, se han analizado estadísticamente muchas colecciones de árboles genealógicos, usando las herramientas del análisis de segregación para averiguar el modo de herencia más probable. En la clínica, la interpretación del árbol genealógico es un arte más que una ciencia. Se trata sobre todo de una cuestión de formulación de hipótesis para la posterior investigación. La hipótesis puede implicar cualquiera de las siguientes causas:

- Una anomalía cromosómica
- Una enfermedad autosómica dominante con penetrancia total o parcial
- Una enfermedad autosómica recesiva
- Una enfermedad ligada al X, dominante o recesiva
- Una enfermedad causada por un defecto en el ADN mitocondrial
- Una enfermedad multifactorial
- Una causa no genética

En el Caso 5 (familia Elliot) las anomalías cromosómicas pueden corresponder a un patrón mendeliano de segregación. Veremos un patrón mendeliano cuando el fenotipo es producido por algo en una única localización fija en un cromosoma; independientemente de si ese "algo" resulta ser un gen clásico o una anomalía cromosómica.

El *Cuadro 1.4* resume las características de los principales patrones de herencia mendeliana. Las posibles investigaciones incluyen:

- Identificación clínica del síndrome, pero teniendo en cuenta que algunos síndromes clínicamente definidos pueden tener más de un modo de herencia.
- Cariotipo (ver *Capítulo 2*).
- Análisis de mutaciones en genes candidatos (ver *Capítulo 5*).
- Análisis de anomalías bioquímicas, incluyendo anomalías de la función mitocondrial (ver *Capítulo 8*).
- Comprobar la inactivación selectiva del cromosoma X (ver *Capítulo 7*).

Cuadro 1.4

Resumen de los modos de herencia

Autosómica dominante:

- Patrón vertical del árbol genealógico, con múltiples generaciones afectas.
- Padres e hijos de afectos son normales.
- Cada hermano de un niño afecto tiene una posibilidad de cada 2 de ser afecto.
- Hombres y mujeres están igualmente afectados.

Autosómica recesiva:

- Patrón horizontal del árbol genealógico, con uno o varios hermanos afectos; con frecuencia un único caso afecto.
- Padres e hijos de afectos son normales.
- Cada hermano de un niño afecto tiene una posibilidad de cada 4 de ser afecto.
- Hombres y mujeres están igualmente afectados.
- Los niños afectos a veces son el producto de matrimonios consanguíneos. En familias con múltiples matrimonios consanguíneos, se ven individuos afectos en varias generaciones.

Recesiva ligada al X:

- Patrón de "movimiento de caballo" del árbol genealógico: los chicos afectos pueden tener tíos maternos afectos.
- Padres e hijos de afectos son normales. Nunca se transmite de padre a hijo (varón).
- Los afectos son sobre todo hombres: las mujeres pueden ser portadoras y los hombres afectos en el árbol genealógico están relacionados a través de mujeres, no de hombres no afectos.
- Los hermanos futuros de un niño afecto tienen una posibilidad de cada 2 de ser afectos; las hermanas no son afectas pero tienen una posibilidad de cada 2 de ser portadoras.

Dominante ligada al X:

- Características muy similares a los árboles autosómicos dominantes, excepto que todas las hijas y ningún hijo de un padre afecto son afectas.
- La enfermedad es a menudo más leve y variable en las mujeres que en los hombres.

Ligada al Y:

- Patrón vertical del árbol genealógico.
- Todos los hijos varones de un padre afecto son afectos.
- Solo son afectos los varones.

Mitocondrial:

- Patrón vertical del árbol genealógico.
- Los hijos de varones afectos nunca son afectos.
- Todos los hijos de mujeres afectas son afectos, pero las enfermedades mitocondriales habitualmente son extremadamente variables, incluso dentro de una misma familia.

Para formar una hipótesis, se estudian los árboles genealógicos para ver que modo de herencia se ajusta mejor. La hipótesis inicial está basada en estas preguntas:

(1) ¿Muestra el árbol genealógico que la persona afecta tiene al menos un pariente afecto? Si la respuesta es sí, la enfermedad es dominante; si no, recesiva. Una enfermedad dominante se manifiesta en cualquier persona que es portadora del gen relevante. Salvo nuevas mutaciones, una persona afecta ha debido heredar el gen de uno de sus padres, también afecto.
(2) ¿Hay algún efecto de género? Por ejemplo, ¿afecta la enfermedad a ambos sexos y se transmite de padres a hijos con independencia del sexo? Si no hay efectos de género, la enfermedad es probablemente autosómica. Observa especialmente la transmisión varón-varón: este es un punto fuerte en contra de la herencia ligada al X, porque un padre nunca transmite su cromosoma X a su hijo varón. Si aparecen efectos de género, entonces puede ser ligada al X, aunque como se explica abajo, puede haber otras razones para la predisposición sexual. A menos que el árbol genealógico sea excepcionalmente grande, los efectos aparentes pueden ser sólo fluctuaciones aleatorias.

Tras llegar a una hipótesis inicial, el siguiente paso es analizarla escribiendo los genotipos, como en la *Figura 1.13*. Si se tienen en cuenta determinadas casualidades (nuevas mutaciones, portadores de la enfermedad que se casan en

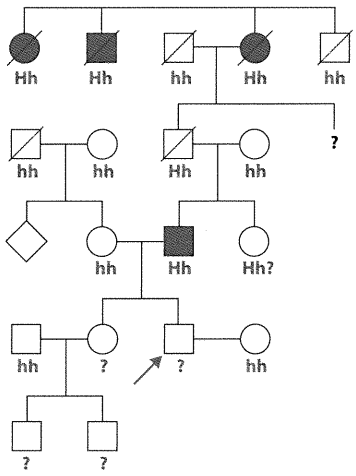


Figura 1.13 – Árbol genealógico de la enfermedad de Huntington de la *Figura 1.1* con los genotipos anotados.
Por consenso, la letra mayúscula se utiliza para el alelo que determina el carácter dominante y la minúscula determina el carácter recesivo. En este ejemplo el alelo de la enfermedad es dominante. Observe que en esta familia las personas afectas son heterocigotas. Esta es la situación normal en enfermedades dominantes. Los homocigotos son raros o desconocidos; cuando se han observado, suelen estar afectados más gravemente que los heterocigotos. No obstante, tal enfermedad es correctamente descrita como dominante (no semidominante). Dominancia y recesividad son propiedades de los fenotipos (caracteres, enfermedades...), no de los genes. Un carácter es **dominante** si se manifiesta en heterocigosidad, y este es el caso de la enfermedad de Huntington, uno de esos casos raros donde se sabe que existen los homocigotos y son fenotípicamente iguales que los heterocigotos.

la familia, etc.), cualquier árbol genealógico se puede adaptar a casi cualquier modo de herencia. El modo de herencia más probable es aquel que requiere el menor número de tales casualidades; preferiblemente ninguna. Si requieres alguna casualidad para probar tu hipótesis, entonces deberás buscar una nueva hipótesis que se adapte mejor. Los árboles genealógicos en los exámenes académicos siempre tienen una única respuesta correcta. La vida real no es siempre tan fácil: muchos árboles genealógicos reales son ambiguos o no encajan con los patrones mendelianos estándar. La enfermedad puede ser multifactorial, sugerente de anomalía cromosómica o debida a una causa no genética.

Penetrancia y expresividad. Riesgos en la interpretación y el consejo

Muchas enfermedades muestran principalmente un patrón genealógico autosómico dominante, pero ocasionalmente salta una generación: esto es, una persona no afecta que tiene un padre afecto, tiene uno o más hijos afectos. Así, ocasionalmente, una persona puede ser portadora del gen causante pero no manifestar la enfermedad. A semejante suceso se le denomina no penetrancia. La **penetrancia** de un carácter se define como la proporción de personas con el genotipo causal, que muestra el carácter.

La penetrancia es una propiedad del gen y del carácter. Síndromes diferentes muestran de forma característica diferentes penetrancias, pero diferentes signos de un síndrome pueden también tener diferentes penetrancias. La penetrancia puede también relacionarse con la edad, como en la enfermedad de Huntington.

La no penetrancia es un riesgo en la interpretación del árbol genealógico y en el consejo genético. La *Figura 1.14* muestra un ejemplo. El individuo III-11 debe ser portador del gen de la enfermedad aunque no esté afecto. Antes de formar una familia ha pedido consejo genético para conocer el riesgo que tiene de tener un hijo con la enfermedad de la familia. El genetista quisiera conocer la penetrancia de esta enfermedad en particular para poder calcular el riesgo de, aun siendo fenotípicamente normal, ser portador de un gen no penetrante. Afortunadamente en muchos casos, el análisis molecular es válido para dar una respuesta definitiva.

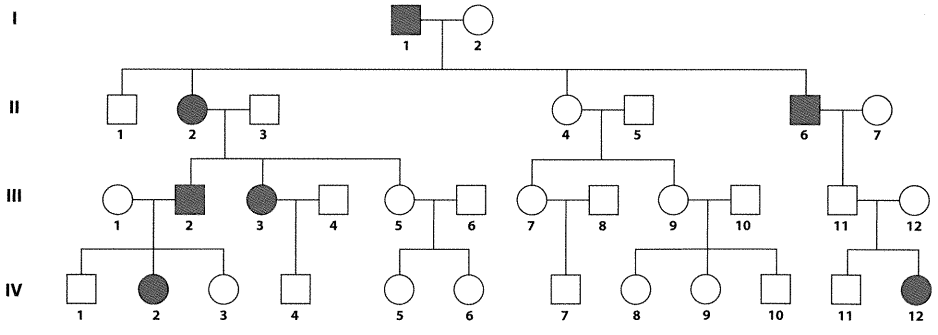


Figura 1.14 – **Árbol genealógico de una enfermedad autosómica dominante con penetrancia reducida.**
La enfermedad tiene penetrancia nula en el individuo III-11. Otros individuos no afectos en la generación IV que tienen un padre afecto podrían también ser portadores del gen con penetrancia nula.

La penetrancia reducida es un problema para los genetistas, pero lo que ocurre no es ningún misterio. Realmente la sorpresa es que algunas enfermedades muestran una penetrancia del 100%. En estas enfermedades, si eres portador del gen pertinente inevitablemente manifestarás la enfermedad, independientemente de tus otros genes, tu ambiente y tu estilo de vida. Para muchas enfermedades, tener el gen significa que tienes muchas probabilidades de manifestar la enfermedad, pero en contadas ocasiones una suerte de combinación de otros genes y/o factores ambientales pueden salvarte.

Existe un completo espectro de caracteres y genes, que del 100% de penetrancia descienden hasta muy baja penetrancia (*Figura 1.15*). Por ejemplo, en la investigación del cáncer existe gran interés en la identificación de los genes de baja penetrancia que hacen que una persona tenga más probabilidades de desarrollar cáncer, pero no hacen que sea un hecho inevitable (ver *Capítulo 12*). Los caracteres de alta penetrancia se corresponden con los mendelianos; aquellos de baja penetrancia, con los multifactoriales (ver *Capítulo 13*). No existen normas claras de dónde ocurren los cambios. La penetrancia reducida puede suceder con caracteres recesivos, pero es mucho menos obvia en el árbol genealógico, así que en la práctica la penetrancia incompleta en gran parte es un problema de las enfermedades dominantes.

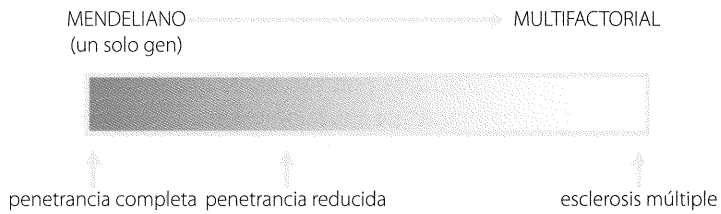


Figura 1.15 – Espectro de penetrancia.
Existe un espectro de penetrancia desde enfermedades con penetrancia completa, donde los demás genes y los factores ambientales no tienen repercusión, hasta genes de baja penetrancia que juegan un papel pequeño, junto con otros factores genéticos y ambientales, en la determinación de la susceptibilidad de la enfermedad. La esclerosis múltiple se utiliza como ejemplo de enfermedad multifactorial donde los factores genéticos juegan un gran papel en la determinación de la susceptibilidad, pero donde cada factor individualmente tiene muy baja penetrancia (ver *Capítulo 13*).

Las enfermedades genéticas a menudo muestran **expresión variable.** Esto es, el cuadro completo de la enfermedad implica un número determinado de características, pero muchos afectos muestran sólo algunas de estas, o pueden mostrar una característica determinada en diferentes grados. La neurofibromatosis tipo 1 (NF1; ver *Cuadro de enfermedad 1*) es un ejemplo de una enfermedad autosómica dominante muy variable. Podríamos decir que cada característica del síndrome tiene su propia penetrancia particular, o podríamos decir que el síndrome en su conjunto muestra expresividad variable. En cualquier caso, éste es el reflejo del hecho de que los genes no actúan aislados, sino junto a innumerables genes y la variabilidad ambiental. Cada hijo de una persona con NF1 tiene un 50% de posibilidades de heredar el gen de la enfermedad y debe realizarse un análisis de ADN, pero no sabremos cuál será la gravedad de la afectación del niño.

Cuadro de enfermedades 1

Neurofibromatosis tipo 1 (OMIM 162200)

NF1, también conocida como la enfermedad de von Recklinghausen, es una enfermedad autosómica dominante causada por mutaciones en el gen NF1 localizado en el cromosoma 17. Afecta a 1 persona de cada 3.500, en ambos sexos y en todos los grupos étnicos. La penetrancia es completa, algunos síntomas de esta enfermedad pueden ser encontrados en todas las personas afectas, pero la enfermedad puede manifestarse de múltiples formas y grados de severidad.



(a) (b) (c)

Pacientes ligeramente afectos muestran solo manchas café con leche en la piel (a), nódulos de Lisch (hamartomas en el iris) y/o pecas axilares. Los neurofibromas dérmicos (b) son frecuentes y pueden ser numerosos y muy deformantes (c).

Los pacientes NF1 también son propensos a desarrollar una variedad de tumores benignos o malignos, incluyendo tumores de la vaina nerviosa, gliomas y otros tumores en el sistema nervioso central. En ocasiones tienen problemas de aprendizaje, baja estatura o convulsiones.

El consejo genético en la NF1 puede ser muy difícil. Casi la mitad de los casos son nuevas mutaciones (lo que es común en enfermedades dominantes con clínica grave, ver *Capítulo 10*). Los pacientes sin historia familiar no entienden el riesgo genético y las personas ligeramente afectas no son conscientes de que sus hijos podrían estar gravemente afectados. Aunque el gen NF1 está clonado, el diagnóstico molecular de mutaciones es difícil porque el gen es muy grande (59 exones, 350kb, ver *Capítulo 3*). Incluso si el análisis del ADN averigua la mutación de una familia, no podemos predecir el grado de severidad que sufrirá el portador de la mutación.

La NF1 ejemplifica los problemas de la expresión variable en una enfermedad autosómica dominante.

Modos de herencia poco frecuentes

Herencia dominante ligada al X

Para los hombres, las enfermedades ligadas al X nunca son dominantes ni recesivas, porque la dominancia y la recesividad son propiedades de los heterocigotos, y los hombres solo tienen un único cromosoma X. Como se explica más adelante en el *Capítulo 7*, el fenómeno de la inactivación de la X significa que incluso para las mujeres heterocigotas, la dominancia y la recesividad no está tan clara para las enfermedades ligadas al X como para las autosómicas. La mayoría de las enfermedades ligadas al X rara vez afectan a mujeres heterocigotas significativamente y, de este modo, se describen como recesivas. De manera poco frecuente las enfermedades ligadas al X afectan gravemente a heterocigotos y entonces, son dominantes. Un ejemplo es la hipofosfatemia ligada al X (OMIM 307800; un defecto de los riñones para retener fosfato, dando lugar a raquitismo resistente a la vitamina D). A primera vista el patrón del árbol genealógico (*Figura 1.16*) podría ser interpretado como autosómico dominante. Coherente con esta interpretación, existe un patrón vertical y en promedio, el 50% de los hijos de una persona afecta son afectos. Sin embargo, un hombre transmite su cromosoma X a todas sus hijas pero a ninguno de sus

hijos varones. Así, todas las hijas pero ninguno de los hijos varones de un padre afecto serán afectos. A causa de la inactivación del X, las enfermedades dominantes ligadas al X tienden a ser más leves y más variables en las mujeres que en los hombres.

Otras causas de predisposición sexual

La predisposición sexual no es un indicador fiable de ligamiento al X. Una enfermedad autosómica puede afectar solamente a un sexo por razones anatómicas o fisiológicas. Por ejemplo, el cáncer de ovario puede ser causado por mutaciones en el gen *BRCA2* en el cromosoma 13, pero obviamente afecta sólo a las mujeres. Semejantes enfermedades se denominan *limitadas al sexo*. En ocasiones una enfermedad puede ser letal en un sexo pero no en el otro. Si esto ocurre antes del nacimiento, el resultado será que solo veremos la enfermedad en uno de los sexos y no en el otro. Esto es más probable en enfermedades dominantes ligadas al X donde las mujeres heterocigotas sobreviven pero los varones afectos mueren en el útero. Un ejemplo es el síndrome de Rett (OMIM 312750; ver *Cuadro de enfermedad 7*). Los fetos masculinos afectos normalmente se abortan en etapas tempranas del embarazo; de este modo solo veremos este síndrome en niñas. Unos pocos varones afectos consiguen sobrevivir al nacimiento, pero su fenotipo es tan diferente que no es reconocible a no ser que mediante análisis moleculares se demuestre que tienen mutaciones en *MECP2*, que es el gen mutado en la mayoría de los casos del síndrome de Rett.

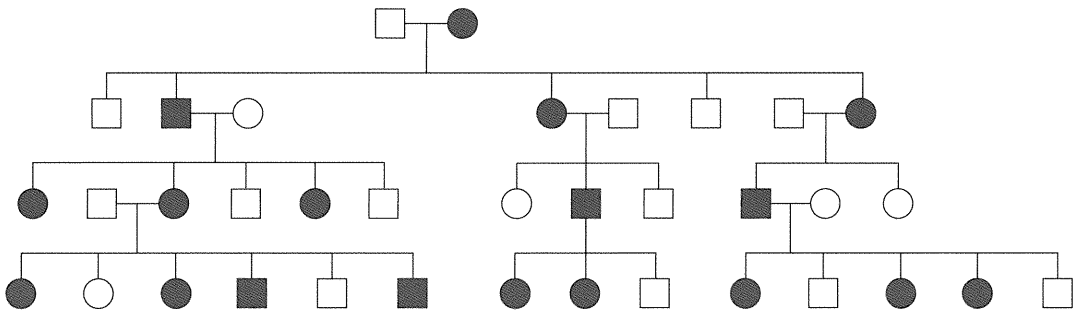


Figura 1.16 – Árbol genealógico de una enfermedad dominante ligada al X. Aunque las mujeres heterocigotas estén afectas, estas enfermedades son frecuentemente más leves y más variables en las mujeres que en los hombres.

Herencia ligada al Y

El patrón de herencia de una enfermedad determinada por un gen en el cromosoma Y es simple y notorio. Solo va a afectar a varones y todos los hijos varones de un hombre afecto van a ser afectos. Sin embargo, el cromosoma Y es portador únicamente de alrededor de 50 genes, y ya que las mujeres pueden arreglárselas perfectamente bien sin ninguno de ellos, ninguno de esos genes debe ser esencial para la vida o la salud. Los genes ligados al Y son importantes para la función sexual masculina; las anomalías del cromosoma Y son una causa común de infertilidad masculina. Tales anomalías son clínicamente importantes, pero,

dado que el resultado del fenotipo es la infertilidad, no segregan en los árboles genealógicos de forma multigeneracional.

Herencia mitocondrial

El problema de la familia Fletcher - Caso 6 (*Figura 1.12*) ilustra un modelo raro de herencia. En todos los casos previos estaba implicado el ADN cromosómico del núcleo de la célula. Pero, como veremos en el *Capítulo 3*, la mitocondria también contiene ADN. Las mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt) son responsables de un pequeño grupo de patologías, incluyendo el caso de la familia Fletcher. Cuatro puntos importantes:

(1) Todas las mitocondrias de un embrión derivan del óvulo y ninguna del espermatozoide. Esto nos lleva a un patrón matrilineal de herencia: las mutaciones mitocondriales son transmitidas por la madre, nunca por el padre. La mayoría de las patologías producidas por mutaciones en el ADNmt afectan a ambos sexos por igual. La neuropatía óptica hereditaria de Leber es una excepción: por razones desconocidas afecta más a los hombres.

(2) La mayoría de los componentes y funciones de la mitocondria están controlados por genes localizados en los cromosomas en el núcleo (ver *Capítulo 3*). Muchas enfermedades causadas por un mal funcionamiento de la mitocondria siguen, por lo tanto, patrones típicos de herencia mendeliana. Sólo unas pocas enfermedades mitocondriales son producidas por mutaciones en el ADNmt y siguen un patrón de herencia como el que hemos visto en el caso Fletcher.

(3) Como cada célula contiene muchas mitocondrias, podemos encontrar mitocondrias normales y mutantes en una misma célula (**heteroplasmia**). La proporción puede variar de un tejido a otro y en un mismo tejido a lo largo del tiempo. Esto ayuda a explicar por qué las enfermedades producidas por mutaciones mitocondriales tienen típicamente una penetrancia baja y una expresividad extremadamente variable.

(4) El óvulo contiene muchas mitocondrias, por lo tanto, una madre heteroplásmica puede tener hijos heteroplásmicos. Esto está en contraste con el mosaicismo para las anomalías nucleares (cromosómicas o de un único gen), las cuales pueden no ser heredadas (ver abajo y en el *Capítulo 2*).

Otros problemas en la interpretación del árbol genealógico

Una enfermedad no es necesariamente genética solo porque es **congénita** (presente en el nacimiento) o **familiar** (tendencia a desarrollarse en familias). La enfermedad de Huntington es un ejemplo de enfermedad genética no congénita, mientras muchos defectos de nacimiento (congénitos por definición) son causados por teratógenos ambientales (rubéola o talidomida, por ejemplo). A menos que la enfermedad familiar muestre un claro patrón genealógico mendeliano o una anomalía cromosómica demostrable, puede ser muy difícil decidir qué papel juegan los genes en el desarrollo de la enfermedad. Innumerables caracteres de conducta y algunos físicos pueden ser el resultado del ambiente compartido por la familia más que por los genes que portan. El *Capítulo 13* describe cómo esos problemas "naturaleza-ambiente" pueden ser atajados. Lo opuesto también es cierto: una historia familiar

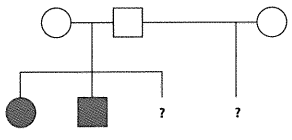
negativa no excluye que el problema no se produzca por una causa genética. Esto es especialmente cierto en las enfermedades autosómicas recesivas, como se ilustra en el caso de la fibrosis quística en la familia Brown – (Caso 2), pero también en enfermedades autosómicas dominantes o ligadas al X cuando se producen por nuevas mutaciones. En el *Capítulo 10* se explica por qué las mutaciones nuevas son frecuentes en algunas enfermedades genéticas y muy raras en otras.

Mosaicismo

Una persona cuyo cuerpo contiene dos o más líneas celulares genéticamente distintas se denomina **mosaico.** Como se explica en el *Capítulo 2*, el proceso de mitosis debe asegurar que cada célula del cuerpo porte un juego completo e idéntico de genes. Esto nos lleva a asumir que si una persona tiene una mutación, esta va a estar presente en cada célula de su cuerpo. Esta aseveración es cierta para las mutaciones heredadas, pero ¿qué pasa con las mutaciones adquiridas recientemente? Las mutaciones se pueden producir en cualquier célula y en cualquier momento. Sólo las descendientes de esa célula portarán la mutación. Dado el número de células del cuerpo humano y el índice de mutación de los genes, es claro que todas las personas tendrán una célula rara o un pequeño clon de células portadoras de una mutación en, al menos, algún gen en el que podamos pensar. Normalmente estos clones no tienen ningún efecto. Hay tres circunstancias en las cuales el mosaicismo puede ser clínicamente importante:

(1) Si las células mutantes tienen tendencia a crecer y transformarse (ver *Capítulo 12*).
(2) Si la mutación surge lo bastante pronto en el desarrollo embrionario, por lo que la línea mutante puede dar lugar a una parte significativa del cuerpo completo. La persona puede mostrar características de la enfermedad, quizá con un fenotipo atenuado (si el producto del gen mutado difunde) o con una distribución parcheada de las células mutantes (si el producto del gen permanece en la célula donde se produce).
(3) Si la mutación afecta a la **línea germinal** (espermatozoides, ovocitos o sus progenitores).

El mosaicismo de la línea germinal es una fuente de incertidumbre y confusión en la interpretación del árbol genealógico y el consejo genético. Una persona que, tanto por pruebas clínicas como genéticas, es enteramente normal puede tener va-



RIESGO:		
recesivo	25%	bajo
dominante, mosaico	alto	alto si el padre es el mosaico

Figura 1.17 – Un problema en el consejo.
Una familia que no tiene historia familiar previa de esta enfermedad tiene dos hijos afectos. ¿Es una enfermedad autosómica recesiva o es autosómica dominante siendo uno de los padres mosaico en su línea germinal?

rios hijos con la misma enfermedad dominante o ligada al X si tiene un clon mutante en su línea germinal. Cuando una pareja normal tiene un hijo con una patología dominante, sin historia familiar previa, se trata evidentemente de una nueva mutación. El genetista debe recordar que uno de los padres pude tener un mosaico en la línea germinal. El riesgo de recurrencia es difícilmente cuantificable, porque no conocemos qué proporción de células germinales son portadoras de la mutación, pero no es despreciable. Si una pareja normal tiene dos o más niños afectos, el patrón genealógico (*Figura 1.17*) parecerá recesivo porque los padres no son afectos. Interpretar equívocamente la enfermedad como recesiva podría causar errores graves cuando los niños afectos consulten sobre su riesgo de transmitir la patología. El riesgo podría ser muy bajo para una enfermedad recesiva poco frecuente y, sin embargo, del 50% para una enfermedad dominante.

1.5. Referencias

Páginas web útiles

Para información detallada de las sorderas genéticas visite la página web de la pérdida de audición hereditaria: http://webhost.ua.ac.be/hhh.

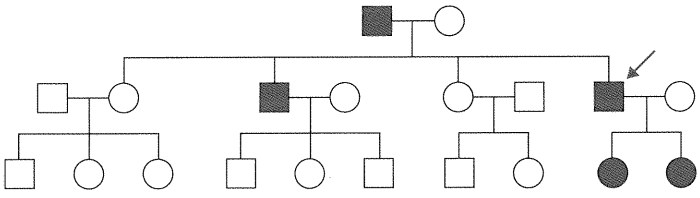
1.6. Ejercicios de autoevaluación

Cada uno de los siguientes árboles genealógicos muestra una enfermedad rara.

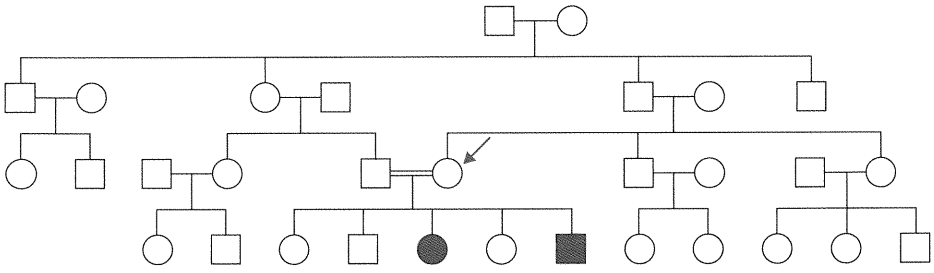
(a) Identifique el modo de herencia más probable, eligiendo entre autosómica dominante (penetrancia total), autosómica dominante con una penetrancia aproximada del 90%, autosómica recesiva o ligada al X recesiva.
(b) Defina el riesgo que tiene de ser afecto el próximo hijo de cada persona marcada con una flecha.

La solución de los árboles genealógicos 1 a 4 está en la *Guía de los ejercicios de autoevaluación* al final del libro.

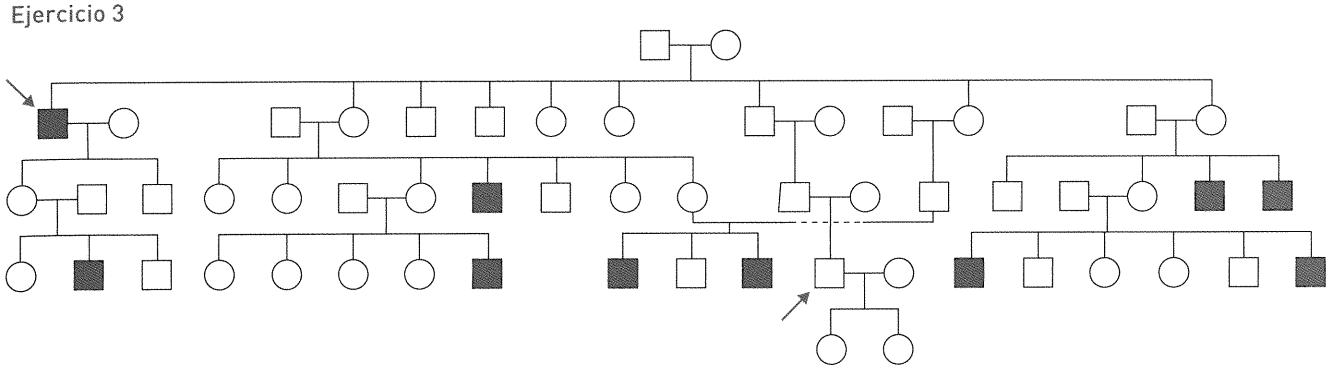
Ejercicio 1



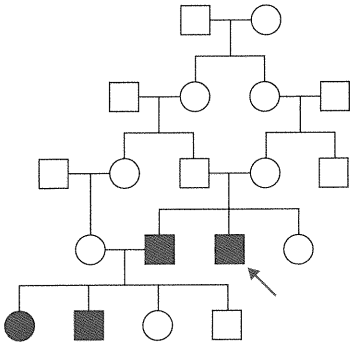
Ejercicio 2



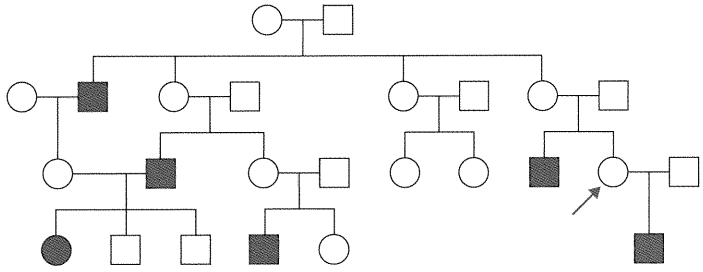
Ejercicio 3



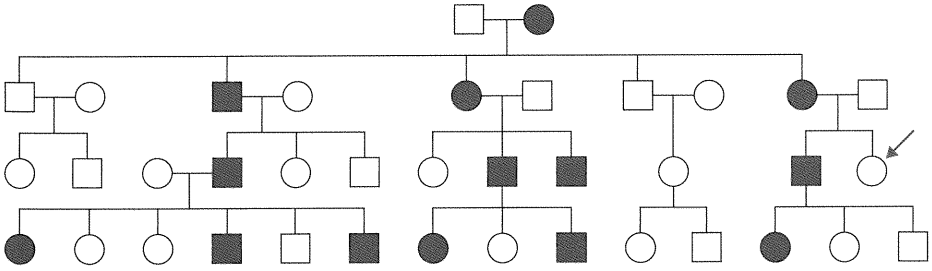
Ejercicio 4



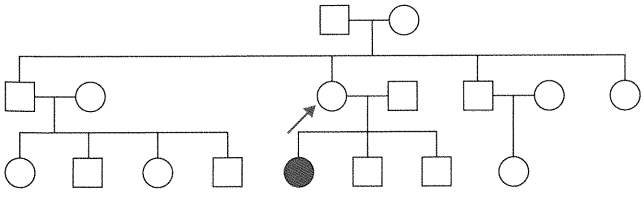
Ejercicio 5



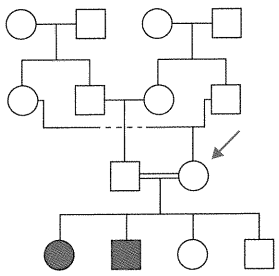
Ejercicio 6



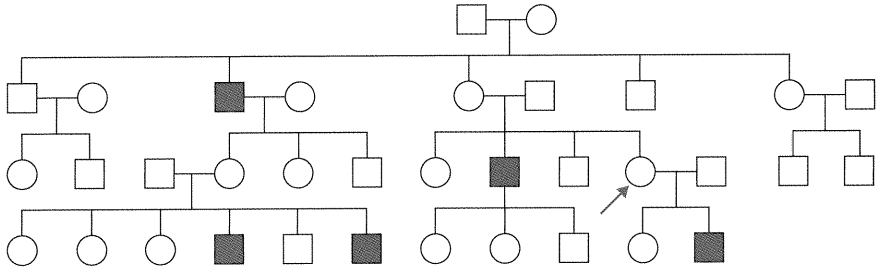
Ejercicio 7



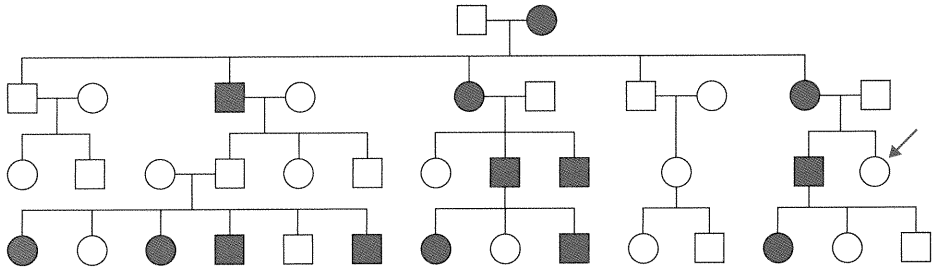
Ejercicio 8



Ejercicio 9



Ejercicio 10



Capítulo **2**

¿Cómo se pueden estudiar los cromosomas de los pacientes?

Conceptos y habilidades que aprenderá en este capítulo

Después de estudiar este capítulo será capaz de:

- Describir los resultados de mitosis y meiosis, y cómo se ha llegado a ellos.
- Identificar cariotipos normales y anomalías sencillas de cariotipos.
- Describir la determinación sexual y las consecuencias de los errores.
- Describir triploidías, trisomías, traslocaciones recíprocas, traslocaciones robertsonianas, inversiones paracéntricas, inversiones pericéntricas y deleciones.
- Explicar el origen de las principales anomalías cromosómicas numéricas y estructurales.
- Extraer las consecuencias reproductivas para portadores de traslocaciones e inversiones.

2.1. Historias clínicas

CASO 7 | Familia Green | **25** | 38 | 68 | 99 | 376

- Niña (Gillian) de 3 años
- Retraso del desarrollo
- ? Anomalía cromosómica
- Realizar test para analizar la microdeleción 22q11

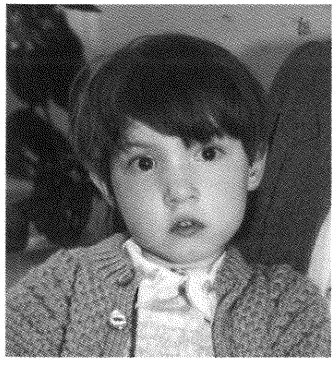


Figura 2.1 – Niña con deleción 22q11. Note la boca pequeña, la nariz estrecha y la inclinación de ojos hacia arriba.

Gillian es la segunda hija de padres sanos. El parto fue normal aunque su peso al nacer fue menor que el de su hermana. En la exploración neonatal de rutina el médico detectó un soplo cardíaco y fue remitida para un ecocardiograma. Este reveló que tiene un pequeño defecto entre las dos cámaras inferiores de su corazón (comunicación interventricular, CIV). No se consideró grave y se recomendó un seguimiento. A los tres años, el soplo desapareció y otro ecocardiograma mostró que la comunicación interventricular se había cerrado. No obstante, los padres de Gillian estaban todavía preocupados, ya que todos los hitos de su desarrollo habían sido más lentos que los de su hermana. Su desarrollo del lenguaje había sido particularmente lento y tuvo dificultades para la comprensión. El pediatra la remitió para estudios del lenguaje y se encontró que tenía movimientos pobres de su paladar. Después se pidió la opinión al genetista clínico. El genetista observó que Gillian tenía una nariz estrecha, plegamiento de la parte alta de sus orejas y dedos largos. Ordenó el estudio cromosómico y, además de realizar un cariotipo de rutina, solicitó un test molecular para ver si tenía una deleción de parte del cromosoma 22 (22q11).

CASO 8 — Familia Howard — 26 | 38 | 68 | 100 | 275 | 376

- Helen, hija recién nacida de Henry y Anne (33 años)
- Síndrome de Down
- ¿Riesgo de recurrencia si tienen más niños?

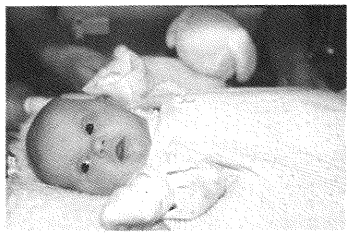


Figura 2.2 – Un niño con síndrome de Down.

El embarazo fue una sorpresa para los padres de Helen, Henry y Anne, que tenían ambos 33 años. Habían tenido un hijo y una hija a los veinte años; sin embargo, cuando conocieron la noticia estuvieron encantados. En la clínica prenatal se les ofreció el test de cribado para el síndrome de Down, pero decidieron rechazarlo porque tampoco lo habían hecho en los embarazos previos y, por otro lado, estaban de acuerdo en que realmente no querían considerar la interrupción del embarazo. El embarazo fue normal, así como el parto a término. Cuando Helen nació, Anne pensó que se parecía a su hermana, pero la comadrona estaba muy preocupada porque parecía muy hipotónica (blanda) y tenía piel redundante en la parte posterior del cuello y un pliegue palmar único en sus manos. El pediatra llamó a Anne y Henry, y con mucho tacto les dijo que estaba preocupado porque Helen podría tener el síndrome de Down. Decidió enviar una muestra de sangre al laboratorio de citogenética pidiendo que el resultado les fuera mandado lo antes posible, ya que los padres y los abuelos estaban muy impacientes. El pediatra y la comadrona vieron a la familia en los dos días siguientes hasta que el resultado estuvo disponible. Este confirmó que Helen tenía el síndrome de Down. Los padres tenían muchas preguntas acerca del futuro de Helen, que fueron contestadas por el pediatra, que sugirió referirlos a genética clínica en pocas semanas para responder a sus preguntas acerca de cómo se produce el síndrome de Down y, además, en el caso de que quisieran tener más niños, sobre el riesgo de recurrencia.

CASO 9 — Familia Ingram — 26 | 41 | 68 | 102 | 182 | 376

- Isabel, primera hija de Ian e Irene
- Talla baja a pesar de la altura de los padres

Isabel fue la primera niña nacida de Ian e Irene, ambos bastante altos. En los primeros meses la niña tenía los pies hinchados y era un poco pequeña, pero en general era un bebé sano. En su infancia se desarrolló normalmente, pero siempre era de los pequeños de la clase. A los diez años de edad sus compañeros de clase aumentaron la tasa de crecimiento, y varias amigas empezaron la pubertad. A pesar de todo, Ian e Irene no estaban preocupados; hasta que la enfermera del colegio les sugirió que Isabel debería ser vista por el pediatra dado que su pequeña estatura parecía inusual comparada con la altura de sus padres. Como parte de los estudios iniciales, el pediatra pidió un análisis cromosómico.



(a) (b) (c)

Figura 2.3 – Síndrome de Turner.
(a) Pies edematosos, (b) Piel redundante en la parte baja del cuello, (c) Histología gonadal: estroma cortical ovárico sin elementos celulares germinales.
Foto (c) cortesía del Dr. Godfrey Wilson, Manchester Royal Infirmary.

2.2. **Antecedentes**

Por qué se necesita conocer los cromosomas

Las anomalías cromosómicas son importantes en numerosas situaciones clínicas:

- Son una causa de infertilidad y abortos de repetición.
- Alrededor del 50% de los embriones que abortan espontáneamente en el primer trimestre tienen una anomalía cromosómica.
- Alrededor de 1 de cada 200 recién nacidos vivos tienen múltiples anomalías congénitas causadas por una anomalía cromosómica. Si los padres lo desean, un *screening* prenatal puede detectar algunas anomalías antes de que el embarazo finalice.
- La mayoría de los niños cromosómicamente anormales han nacido de padres normales, pero alrededor del 1% de las personas tienen un ligero cambio cromosómico que no tiene efecto en su propia salud, pero les condiciona a tener un mayor riesgo de abortos o niños anormales.
- Normalmente las células cancerosas adquieren muchas anomalías cromosómicas no presentes en las células normales del paciente, y determinadas anomalías tienen un significado diagnóstico y pronóstico.

¿Cómo se estudian los cromosomas?

Si quiere estudiar los cromosomas al microscopio necesita células en división. Como se describe a continuación, los cromosomas solo son visibles en células que están en división. Tomando sangre, piel u otras muestras de una persona, se obtendrán abundantes células, pero solo unas pocas estarán en división. De este modo normalmente el análisis cromosómico implica tomar una muestra de células que no se dividen, por lo que hay que cultivar en el laboratorio y estimular su división (*Figura 2.4*). En el *Cuadro 2.1* podemos ver distintas fuentes de células. Además de los métodos de estudio de cromosomas descritos en este capítulo, también puede utilizarse para un estudio cromosómico en más detalle o estudiar el número cromosómico en células en interfase (**no división**) un la citogenética molecular. Está descrita en el *Capítulo 4*.

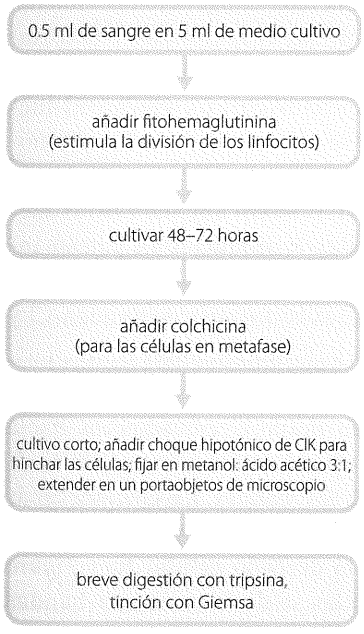


Figura 2.4 – Diagrama de flujo para procesar una muestra de sangre y obtener una preparación cromosómica con bandas-G estándar.

El cariotipo mediante un análisis estándar microscópico, siguiendo el protocolo de la *Figura 2.4*, implica preparar un portaobjetos en el cual un número de células en división puedan ser examinadas. La *Figura 2.10* muestra una de estas células. El citogenetista cuenta los cromosomas, identifica cada uno de ellos y comprueba que su estructura es normal. El análisis normal se realiza en 10 células, de forma que si un hallazgo o signo particular no está claro en una célula, se puede comprobar en otras. Para archivar en la historia, los cromosomas de una células se ordenan (normalmente mediante el proceso de imágenes digitales) en un cariograma estándar (denominado cariotipo) como en las *Figuras 2.9* o *2.11*. Este es el único método de analizar el genoma entero para cualquier anomalía cromosómica numérica o estructural.

Los cromosomas siempre se preparan a partir de células en división, en las cuales el ADN ha sido replicado, y luego siempre se observan al microscopio formados por dos cromátidas hermanas idénticas unidas por el centrómero.

Cuadro 2.1

Material para análisis cromosómicos

- Los **linfocitos de sangre periférica** son la muestra más utilizada. De 0,5 a 10 ml de sangre se cultivan con fitohemaglutinina, que estimula la división de los linfocitos. Los cultivos se sacrifican trascurridas 48 horas. El protocolo está resumido en la *Figura 2.4*.
- Las **vellosidades coriales** se emplean para un diagnóstico prenatal temprano. Normalmente se recogen en la semana 10-12 de gestación vía vaginal o transabdominal. El proceso implica un riesgo de aborto de aproximadamente un 2%. Las células presentes se están dividiendo solas y se pueden utilizar para un análisis rápido, pero se confirman mejor los resultados en células cultivadas. Hay que extraer material fetal para evitar cultivar células maternas.
- El **líquido amniótico** se recoge en la semana 14 a 20 de gestación y contiene células fetales descamadas. Tras 2 semanas de cultivo se consiguen células en división para el análisis.
- La **biopsia de piel** se utiliza para buscar anomalías cromosómicas que pueden no estar presentes en la sangre.
- La **biopsia testicular** es el único camino para estudiar la meiosis masculina. En mujeres, la meiosis tiene lugar en el ovario fetal antes del nacimiento, por ello no hay forma de investigar clínicamente la meiosis en una paciente.

Antes los protocolos de preparaciones estándar hacían que estas estructuras estuvieran muy claras (ver el recuadro en la *Figura 2.10*). Con los protocolos actuales, las cromátidas hermanas se presentan unidas. Los citogenetistas confían en el patrón de bandas para identificar cada uno de los cromosomas y detectar las aberraciones estructurales. Las bandas hacen que cada cromosoma se tiña con un patrón característico y reproducible de bandas oscuras y claras. El método habitual es el de las bandas-G. Esta técnica implica someter a los cromosomas, extendiéndolos en un portaobjetos, a una breve digestión con tripsina, y seguidamente teñirlos con la tinción Giemsa. Algunas veces emplean otros métodos de bandeo para análisis específicos. Las bandas-R producen un patrón inverso a las bandas oscuras y claras, y se emplean para analizar la parte terminal de los cromosomas. Otras técnicas especiales tiñen los centrómeros (Bandas-C) y los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (tinción de plata).

Las regiones cromosómicas se nombran según la convención de París, como se describe en el *Cuadro 2.2*. Las bandas se numeran desde el centrómeros hacia los extremos. La *Figura 2.5* muestra el ideograma estándar y la nomenclatura de los cromosomas con bandas-G con una resolución de 550 bandas. Resoluciones más altas se pueden obtener por tratamientos de las células antes del empaquetamiento máximo de los cromosomas en la metafase de la división celular (ver *Figura* 2.6). En estos cromosomas muy alargados, las bandas se dividen en sub-bandas y estas, a su vez, en sub-sub-bandas, permitiendo una localización más precisa, tal como 7q11.23 (se nombra "7q uno uno punto dos tres". Pero los cromosomas largos pueden entrecruzarse, haciendo el análisis de alta resolución (1500-2000 bandas) en el microscopio muy difícil. Las anomalías que son muy pequeñas para ser vistas por 550 bandas, estándar, se detectan pasando a métodos moleculares. Vamos a ver este proceso en el caso de Gillian Green (Caso 7).

Cuadro 2.2

Anomalías cromosómicas: nomenclatura y glosario

Los **cariotipos** se describen por el número de cromosomas, los cromosomas sexuales y la anomalía. La localización en los cromosomas se describe siguiendo la nomenclatura de la Convención de París que se muestra en la *Figura 2.5*. Así p significa brazo corto; q, brazo largo; t, una traslocación; d, una deleción; dup, duplicación; inv, inversión, y der, cromosoma derivado, cuya estructura debe ser descrita a continuación.

- 46,XX: mujer normal
- 47,XY,+21: varón con trisomía 21
- 46,XX,t(1;22)(q25;q13): mujer con traslocación entre los cromosomas 1 y 22 con puntos de rotura en 1q25 y 22q13 (anomalías del **Caso 5**, *Figura 2.14*)
- 46,XY,del(2)(q34;q36.2): varón con una deleción del brazo largo del cromosoma 2 perdiendo el material situado entre 2q34 y 2q36.2.

Este es suficiente para el propósito actual. Para la nomenclatura completa, que abarque todas las posibles anomalías, ver Shaffer y Tommerup (2005).

Acrocéntrico: cromosoma que tienen su centrómero cercano al final; cromosomas 13, 14, 15, 21, 22 e Y.

Autosoma: cualquier cromosoma que no sea el par sexual X e Y.

Bandas-G: procedimiento estándar en el cual los cromosomas son tratados y teñidos con un patrón característico y reproducible de bandas oscuras y pálidas (ver la *Figura 2.5*).

Cariotipo: constitución cromosómica de una persona; también se usa para denominar la imagen de los cromosomas de una persona, como en la *Figura 2.9*, etc.

Centrómero: la parte del cromosoma donde se juntan las dos cromátidas hermanas y las fibras del huso acromático se unen en la división celular separando cada una de las cromátidas.

Cromátida: en una célula en división, el cromosoma está formado por dos cromátidas hermanas idénticas que se unen por el centrómero. Después de la división celular, y hasta que el ADN es replicado de nuevo, el cromosoma está formado por una sola cromátida.

Cromátidas hermanas: las dos cromátidas de un cromosoma, como se ven en las células en división. Son copias una de otra y este proceso se hace en la fase de replicación del ADN.

Cromatina: en general es el término que se emplea para denominar al complejo ADN-proteína que constituyen los cromosomas.

Cromosomas homólogos: los dos números 1 o 2, etc., de una persona. Hay que tener en cuenta que, a diferencia de las cromátidas hermanas, los cromosomas homólogos no son copias uno de otro; pueden diferir en pequeños fragmentos (diferencias en pequeñas secuencias de ADN) y, en algunas ocasiones, en grandes fragmentos (por una traslocación, etc).

Eucromatina: cromatina con la estructura relativamente abierta en la cual los genes pueden estar activos; es lo opuesto a heterocromatina.

Heterocromatina: cromatina que está altamente condensada y genéticamente inactiva. Se encuentra principalmente en los centrómeros.

Inversión: anomalía estructural en la cual una parte del cromosoma está orientado en dirección contraria al resto (ver *Figura 2.19*).

Metacéntrico: cromosoma que tiene su centrómero en el centro (p.e., cromosoma 3 y 20).

Monosomía: tener solo una copia de un cromosoma en particular y las dos copias del resto de cromosomas (p.e., 45 cromosomas en total para una monosomía autosómica).

Cuadro 2.2 – Continuación

Submetacéntrico: cromosoma que tiene brazo largo y brazo corto, p.e., la mayoría de los cromosomas humanos.

Telómero: estructura especial final de los brazos de un cromosoma.

Traslocación: anomalía estructural en la cual dos cromosomas intercambian dos segmentos no homólogos.

Traslocación robertsoniana: tipo especial de traslocación en la cual dos cromosomas acrocéntricos se unen por los centrómeros como se muestra en la *Figura 2.20.*

Triploidía: tener tres juegos completos de cromosomas.

Trisomía: tener tres copias de un cromosoma en particular y dos copias del resto (p.e., 47 en total).

Anomalías cromosómicas

Las anomalías cromosómicas pueden implicar un número erróneo de cromosomas, o tener una o más anomalías estructurales cromosómicas. La naturaleza y el origen de las anomalías cromosómicas se discuten con más detalle en la *Sección 2.4.* Numerosas anomalías cromosómicas numéricas ocurren con la suficiente frecuencia como para producir síndromes que son clínicamente reconocibles (*Cuadro 2.3*). Como el caso en el que la comadrona reconoció las características del síndrome de Down en Helen Howard (Caso 8). Las anomalías estructurales de los cromosomas son normalmente el resultado de roturas de los cromosomas. Determinadas regiones cromosómicas están predispuestas a roturas específicas que producen síndromes reconocibles (*Cuadro 2.4*). Un clínico informado podría sospechar de algún síndrome en el caso de Gillian Green (Caso 7). Sin embargo, la mayoría de las anomalías estructurales son causadas por esporádicas roturas cromosómicas aleatorias. Aunque estas no producen síndromes específicos determinados, los clínicos han aprendido a sospechar una anomalía cromosómica en lactantes que tengan múltiples anomalías congénitas que no son atribuibles al fallo de un desarrollo específico, o en pacientes con una combinación de retraso mental y dismorfia. Por estas razones sería apropiado realizar un análisis cromosómico en el caso de Elizabeth Elliot (Caso 5).

¿Por qué tenemos cromosomas?

Una célula humana tiene 2 m de ADN. Imaginemos una célula típica, de 10 µm de ancho, expandida al tamaño de una biblioteca de 10 m de ancho. El ADN podría estar representado por 2000 km de cuerda ocupando el máximo espacio en la habitación. Ahora, replicamos el ADN, giramos cada una de las hebras de la cuerda en una doble hebra igual a un cable eléctrico. Y ahora se podría dividir la célula. En una hora una célula divide exactamente su ADN replicado; por ello, cada una de las células hijas lleva una copia exacta de cada una de piezas del ADN. Si quiere evitar enredos imposibles en su biblioteca llena de un cable doble, necesita organizarlo. Esto es lo que hacen los cromosomas en la célula.



Figura 2.5 – Nomenclatura de las bandas de citogenética.
El idiograma muestra un patrón ideal de bandas-G de 550 bandas de resolución. Las bandas principales están marcadas 1,2,3, etc., empezando desde el centrómero hacia el telómero. La banda principal 11q1 (11q significa brazo largo del cromosoma 11, 11p brazo corto) está dividida en sub-bandas 11q11-11q14, y en la máxima resolución 11q14 se divide en 11q14.1- 11q14.3. Modificado de Shaffer y Tommerup (2005) con permiso de S. Karger AG, Basel.

Cuadro 2.3

Síndromes producidos por anomalías numéricas de los cromosomas

Triploidía (69,XXX, XXY o XYY)

La triploidía es frecuente en la concepción, pero los embriones y fetos triploides casi nunca llegan a término, y los que lo hacen no sobreviven mucho tiempo.

Trisomías autosómicas

Todas las posibles trisomías autosómicas se pueden encontrar en los abortos tempranos, pero solo las trisomías 13, 18 y 21 generalmente sobreviven a término. Puede ser significativo que los cromosomas 13, 18 y 21 tengan la menor densidad de genes de todos los cromosomas de nuestro genoma. Esto significa que son pocos los genes que se presentan en número anormal en estas trisomías, comparado con trisomías de otros cromosomas de similar tamaño. A continuación se discute cómo se originan esta trisomías.

- +21 Síndrome de Down: ver **Caso 8**. La única trisomía autosómica compatible con la supervivencia en la edad adulta.
- +18 Síndrome de Edwards: los niños afectados normalmente mueren en el primer año de vida. A pesar de todo, exteriormente pueden ser relativamente normales, tienen rasgos malformativos leves, retraso en el crecimiento y muchas malformaciones internas. Los que raramente sobreviven cierto tiempo muestran escaso desarrollo.
- +13 Síndrome de Patau: el 50% de los niños afectados mueren en el primer mes de vida y el resto dentro del primer año. Pueden tener malformaciones de la línea media del cráneo y su cara, variando desde leves (ojos juntos, labio hendido medial) a graves (malformaciones severas de la cara con un único ojo central y holoprosencefalia: fallo en el desarrollo de los dos hemisferios del cerebro). La polidactilia es otro rasgo común.

Anomalías de los cromosomas sexuales

Tener errores en los cromosomas sexuales es mucho menos deletéreo que tenerlos en los cromosomas autosómicos. En el caso del cromosoma Y se debe a que tiene muy pocos genes, y ninguno es esencial para la vida. El cromosoma X es diferente: tiene alrededor de 1000 genes, incluyendo algunos que son esenciales para la vida, pero el mecanismo de inactivación del X (ver *Capítulo 7*) reduce mucho el efecto de tener diferente número de cromosomas X.

Como en los ejemplos que a continuación se muestran, una persona es masculina si tiene un cromosoma Y, independientemente del número de cromosomas X. El gen *SRY*, en el cromosoma Y, se cree que es el principal interruptor en la diferenciación sexual (Ver *Cuadro de enfermedad 6*).

- 45,X Síndrome de Turner: mujeres, fallo en la pubertad, infértiles. Frecuentemente con talla baja, inteligencia normal. Pueden tener cuello con *pterigium*, malformaciones cardíacas (coartación) y riñones en herradura.
- 47,XXY Síndrome de Klinefelter: varones, fallo en la pubertad, infértiles y frecuentemente altos con distribución femenina de la grasa corporal. Pueden tener un coeficiente intelectual ligeramente bajo al compararlos con sus hermanos.
- 47,XXX Mujeres, la mayoría sin diagnosticar porque son relativamente normales. Pueden tener un coeficiente intelectual ligeramente bajo al compararlas con sus hermanos.
- 47,XYY Hombres, altos, posiblemente de inteligencia levemente reducida pero dentro de los rangos normales. La gran mayoría de los hombres XYY viven una vida normal y no están diagnosticados, pero pueden tener un ligero aumento en el riesgo de tener problemas de comportamiento.

Cuadro 2.4

Síndromes de microdeleción recurrentes

Muchos síndromes clínicos conocidos están causados por **microdeleciones;** es decir, una deleción de un segmento del cromosoma demasiado pequeña como para verse en una preparación estándar de cromosomas como la que se muestra en la *Figura 2.9.* Cuando un clínico avezado sospecha de una microdeleción como causa clínica, esta puede ser detectada y caracterizada usando las técnicas citogenéticas moleculares descritas en el *Capítulo 4.* Algunos de los síndromes asociados a una microdeleción bien definida se muestra en la tabla.

Síndrome	Número OMIM	Localización	Comentarios
Wolf–Hirschhorn	194190	4p16	Bajo peso al nacer, retraso mental, convulsiones, cara peculiar
Cri-du-chat	123450	5p15	Retraso mental, cara peculiar, llanto muy agudo
Williams–Beuren	194050	7q11.23	Ver el *Cuadro de enfermedad 3*
Angelman	105830	15q11–q13	Ver *Capítulo 7*
Prader–Willi	176270	15q11–q13	Ver *Capítulo 7*
Miller–Dieker	247200	17p13	Lisencefalia, retraso mental, cara peculiar
Smith–Magenis	182290	17p11	Retraso mental, problemas de comportamiento, patrón anormal de sueño
Di George–VCFS	188400	22q11	Ver **Caso 7, familia Green**

Muchas otras microdeleciones esporádicas o recurrentes se han descrito. Además de las vistas en la tabla, los síndromes de Wolf-Hirschhorn, cri-du-chat y Miller-Dieker implican deleción de la zona terminal del brazo de un cromosoma. Normalmente este es el resultado de una rotura al azar; las roturas proximales varían entre diferentes pacientes, pero la deleción siempre abarca la región crítica específica del síndrome. Los otros síndromes de la tabla tienen el mismo punto de rotura en todos los pacientes, causando una deleción específica de un segmento interno del cromosoma. Surgen por recombinación entre repeticiones cortas de ADN mal apareadas, como las explicadas en el *Cuadro de enfermedad 3.*

Centrómeros y telómeros

Los cromosomas no son únicamente un empaquetamiento pasivo de ADN. Son orgánulos funcionales celulares y parte de su función depende de dos estructuras especiales, los centrómeros y los telómeros.

- Un cromosoma funcional debe tener un centrómero, y solo uno. Como ya se mencionó, las dos cromátidas hermanas están unidas en el centrómero. Este (o, para ser más exactos, el cinetocoro, una estructura localizada en el centrómero) es el punto de unión de las fibras del huso que separan los cromosomas durante la división celular (ver a continuación).

- Los telómeros son estructuras del extremo de cada cromosoma. Contienen una gran matriz de secuencias repetidas en tandem (TTAGGG). Debido a la cuidadosa replicación enzimática del ADN, cada extremo del cromosoma pierde 10-20 unidades de repetición cada vez que la célula se divide (ver *Figura 12.3*). Si el telómero se pierde totalmente el cromosoma se hace inestable, llevando a la muerte celular. Algunas teorías relacionan este proceso con el envejecimiento. Los telómeros tienen suficientes repeticiones como para sobrevivir a las divisiones celulares que acaecen en la vida de una persona, pero entre generaciones necesitan ser renovados. Las células de la línea germinal, y las células cancerosas, producen una enzima especial, **telomerasa**, que puede restaurar la longitud entera de los telómeros, ayudando a hacer algunas células inmortales.

Comportamiento de los cromosomas en la división celular

Preparación para dividirse

Como se discutió arriba, la primera función de los cromosomas es permitir a la célula distribuir su ADN a las células hijas de un modo ordenado:

(a) *Replicación del ADN.* Cada cromosoma contiene una única doble hélice de ADN inmensamente larga. Cuando la célula se prepara para dividirse, durante la fase S del ciclo celular, el ADN se replica, pero las dos copias permanecen pegadas una a otra. Entonces cada cromosoma está formado por dos cromátidas hermanas idénticas unidas por el centrómero y cada una contiene una copia entera de la doble hélice de ADN. Como se ha visto al microscopio, los cromosomas siempre tienen esta estructura (raramente las dos cromátidas hermanas se distinguen en preparaciones estándar), pero es importante recordar que el estado normal de los cromosomas en una célula que no se divide es con una sola cromátida.

(b) *Condensación de los cromosomas.* Durante la etapa temprana de la división celular (**profase**) los cromosomas se hacen mucho más compactos, hasta que se hacen visibles al microscopio.

Hay dos tipos de división celular:

- **Mitosis** es la forma normal de la división celular, la forma en la que los cromosomas se estudian habitualmente. En la mitosis el ADN replicado se divide exactamente igual entre las dos células hijas; por ello son iguales.
- **Meiosis** es una forma especializada de división celular que se emplea solo para producir gametos (espermatozoides u óvulos). La meiosis tiene dos propósitos. Primero, el número de cromosomas debe ser reducido de 46 a 23, de forma que cuando el espermatozoide y el óvulo se unen, el resultado sean 46 cromosomas. Segundo, la meiosis emplea dos mecanismos, descritos a continuación, para asegurar que todos los gametos lleven una nueva y única combinación de los genes parentales. Como se menciona en el *Cuadro 2.1*, se puede estudiar clínicamente la meiosis en los varones a través de una biopsia testicular y puede ser parte de la investigación de la infertilidad masculina. La meiosis femenina es virtualmente imposible estudiar en humanos porque tienen lugar en el feto. A pesar de todo, las consecuencias de los errores en meiosis son primordiales para los citogenetistas clínicos.

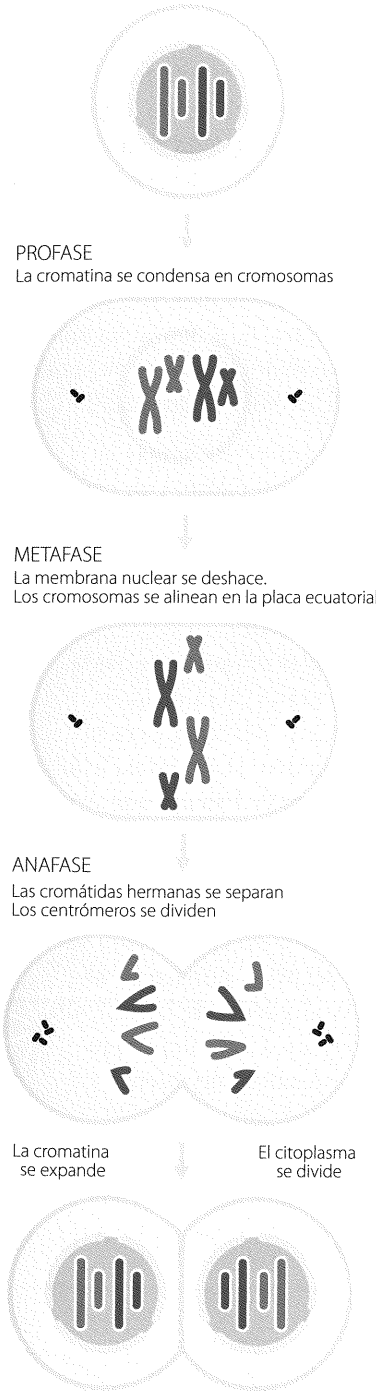


Figura 2.6 – Los estadios de la mitosis.

Mitosis

En la mitosis (*Figura 2.6*), cuando cada cromosoma se hace visible, tiene dos cromátidas hermanas altamente condensadas unidas por el centrómero. Al final de la profase la membrana celular se deshace y los cromosomas se mueven al centro de la célula. La posición del núcleo de las dos células hijas está previamente marcado por unos ejes radiados de microtúbulos. Estos se pegan al centrómero de cada uno de los cromosomas. Cada cromosoma es arrastrado por los microtúbulos de forma radial desde ambos extremos de la célula. Los microtúbulos contraídos empujan los cromosomas para unirse a la placa ecuatorial de la célula (**metafase**). Eventualmente el centrómero de cada uno de los cromosomas se divide; por ello, como los microtúbulos continúan contrayéndose, una cromátida de cada cromosoma es empujada a cada uno de los polos de la célula (**anafase**). Una vez que todas la cromátidas han llegado a los polos se descondensan, la membrana celular se forma alrededor de ellas y la célula se divide.

Nótese dos características de la mitosis:

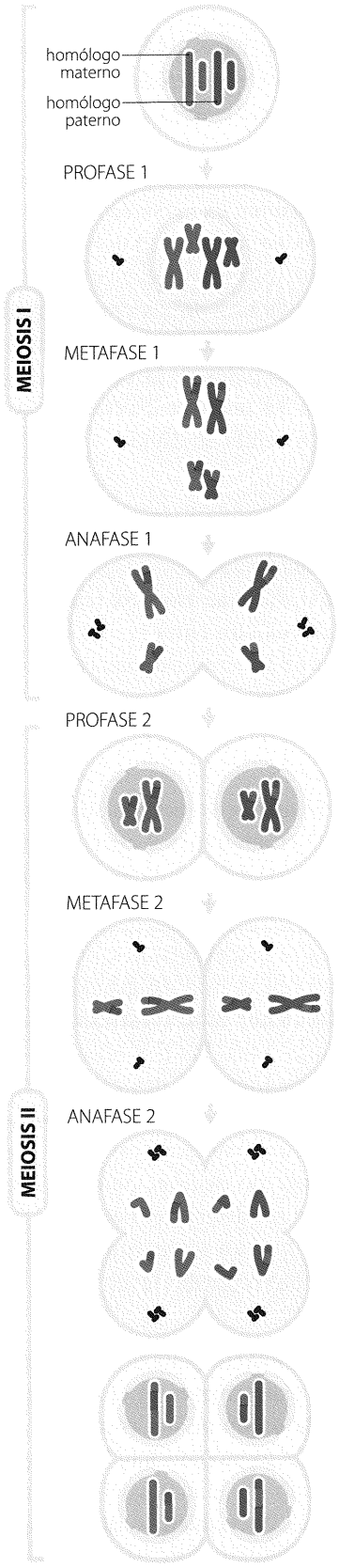
- las cromátidas hermanas son copias una de otra, y cada una de las células hijas recibe una cromátida de cada uno de los cromosomas.
- cada cromosoma se comporta independientemente. Aunque hay dos copias de cada cromosoma (homólogas), las dos no interaccionan entre sí. Obsérvese la *Figura 2.10* y nótese la colocación al azar de los cromosomas en una preparación. Es una diferencia clave entre meiosis y mitosis.

Meiosis

Es la forma altamente especializada de división celular que se emplea solo para producir gametos (*Figura 2.7*). Los gametos tienen 23 cromosomas y cada gameto es genéticamente único. La meiosis consiste en dos divisiones celulares; la meiosis II es similar a la mitosis, pero la meiosis I tiene características especiales.

Durante la profase I los cromosomas se condensan y se hacen visibles, como en la mitosis, pero en la meiosis I los objetos que aparecen no son 46 cromosomas separados, sino 23 bivalentes (*Figura 2.8*). Cada bivalente es una estructura de cuatro cadenas que constan de dos cromosomas homólogos (los dos números 1, etc.), cada uno de los cuales tiene dos cromátidas hermanas. Las dos cromátidas hermanas de un cromosoma son idénticas porque son copias una de la otra, pero los dos homólogos no son idénticos. Se podría pensar que cada uno es como una larga línea de casillas. Cada uno tendrá el mismo juego de casillas, pero el contenido de las casillas correspondientes a los dos puede ser diferente. Por ejemplo, cerca del extremo del brazo largo del cromosoma 9 hay un locus (una casilla) para el grupo sanguíneo ABO. Pero uno de los homólogos puede llevar el gen A y el otro el gen O. No son copias uno de otro.

El emparejamiento de los homólogos es sumamente exacto. Cuando hay una anomalía estructural y los homólogos no coinciden exactamente el emparejado de segmentos coincide (a menos que esto implique la unión de los cromosomas en nudos imposibles). La *Figura 2.17* muestra este efecto cuando hay una traslocación, y la *Figura 2.21* muestra qué sucede cuando un homólogo tiene una inversión. En la meiosis masculina los cromosomas X e Y también se emparejan. Aunque la mayoría de su secuencia es totalmente diferente, hay una pequeña



región de homología en los extremos de los brazos cortos (la región pseudoautosómica, ver *Sección 7.2*) y el X e Y se emparejan final-con-final.

En la anafase I las fibras del huso separan a los cromosomas. En la mitosis el centrómero de cada uno de los cromosomas se divide y cada una de las dos cromátidas hermanas se separan; pero en la meiosis I los dos cromosomas homólogos se separan, cada uno todavía formado por dos cromátidas hermanas unidas por el centrómero. Hasta aquí, en el final de la meiosis I cada célula hija tiene 23 cromosomas, cada uno de los cuales está formado por dos cromátidas hermanas. En la meiosis II las cromátidas hermanas se separan, como en la mitosis, para que el producto final de la meiosis sean cuatro células; cada una contiene 23 cromosomas con una sola cromátida. El Caso 8 (familia Howard) y el Caso 5 (familia Elliot) muestran ejemplos de qué puede fallar en estas etapas.

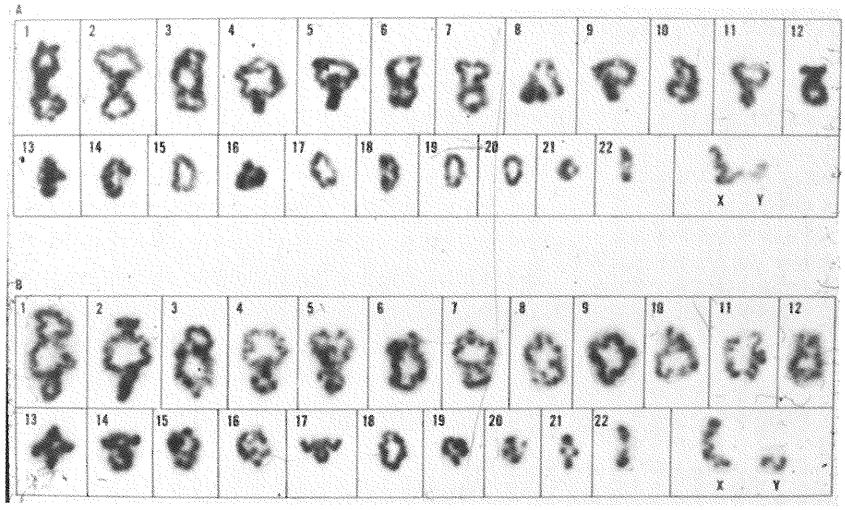
El sexo solo tiene un fin en biología: producir una nueva combinación de genes. En parte esto se consigue simplemente por el hecho de participar dos personas diferentes en el proceso de la reproducción sexual. Pero hay dos mecanismos adicionales para trabajar generando todavía más novedades y ambos dependen del modo en que los cromosomas se comportan en la meiosis (*Figura 2.7*).

(1) Cuando una persona forma un gameto, solo uno de sus cromosomas 1 estará dentro del gameto. Podría ser de su madre o de su padre. Con cada uno de los cromosomas tendremos dos elecciones: podremos escoger el materno o el paterno. En todos los 23 cromosomas tenemos $2 \times 2 \times 2 \times 2 \times \ldots = 2^{23}$ modos diferentes de elegir el número 1, el número 2, etc. Esto conduce a un gameto particular; 2^{23} es 8.388.608.

(2) El segundo mecanismo aumenta el número de posibles variaciones hasta el infinito. Como ya se mencionó, en las primeras etapas de la meiosis los cromosomas homólogos (los dos números 1, etc.) se aparean. Pero no permanecen simplemente juntos (sinapsis); intercambian segmentos. Esto es la recombinación genética. El ADN de un homólogo es físicamente cortado y unido al ADN del otro cromosoma homólogo. El mecanismo de la recombinación es complicado. Parece implicar el corte del ADN de dos cromosomas en la misma posición, lo más cerca de un único nucleótido y uniendo los bordes en el otro cromosoma. Realmente no es así como se produce; en realidad, después del primer corte el segundo se hace en algún sitio vecino, y entonces el ADN se resintetiza alrededor de la posición del intercambio emparejando las secuencias correctas. Este complicado proceso requiere muchas enzimas y todavía no se conoce muy bien.

Independientemente del mecanismo molecular preciso, el efecto es que los cromosomas homólogos intercambian segmentos. Suele haber un intercambio (punto de recombinación entre los cromosomas en sinapsis) en cada brazo de cada par de cromosomas. Como media hay alrededor de 60 intercambios en cada célula en

Figura 2.7 – Las etapas de la meiosis.
La meiosis se emplea solo para la producción de espermatozoides y óvulos. Consiste en dos divisiones celulares sucesivas, produciendo cuatro células hijas (aunque en la ovogénesis solo una de ellas progresa a un ovocito maduro; las otras forman el corpúsculo polar). La meiosis reduce el número de cromosomas de un gameto a 23 y asegura que cada gameto es genéticamente único.



(a)



(b)

Figura 2.8 – Ejemplos de cromosomas durante la meiosis.
(a) Dos células de una biopsia testicular mostrando los cromosomas durante la profase I de la meiosis masculina. Cada una de las 23 estructuras es un bivalente, formado por dos cromosomas homólogos, teniendo cada uno dos cromátidas. Nótese el emparejamiento terminal-terminal de los cromosomas X e Y. (b) Un bivalente visto en meiosis en un anfibio, como tiene cromosomas largos hacen que la estructura de cuatro cadenas sea clara.

la espermatogénesis, y alrededor de 90 en la ovogénesis, aunque el número real varía considerablemente entre las personas y entre las células. Como aproximación, los intercambios están distribuidos aleatoriamente a lo largo de los 22 autosomas (aunque profundas investigaciones revelan algunas características interesantes no-aleatorias). Así, en todos los óvulos y espermatozoides que produce una persona, cada cromosoma lleva una única combinación de genes que provienen de su padre o de su madre. Este aspecto se vuelve a discutir en el *Capítulo 9,* donde se estudia cómo las enfermedades genéticas pueden ser mapeadas en una localización específica de un cromosoma, ya que la recombinación es la llave del mapeo genético.

Como resultado, cada concepción es una única combinación de un único espermatozoide con un único óvulo. Las únicas personas que no son genéticamente únicas son los gemelos monozigóticos cuyas células han derivado por mitosis de una única concepción original. Que los gemelos monozigóticos sean individuos singulares a pesar de ser clónicos nos recuerda que no todo es genético en la vida.

2.3. Estudio de pacientes

CASO 7 | Familia Green | 25 | **38** | 68 | 99 | 376

- Niña (Gillian) de 3 años
- Retraso del desarrollo
- ? Anomalía cromosómica
- Realizar test para analizar la microdelección 22q11

La combinación de retraso en el desarrollo, malformaciones cardíacas, problemas en el paladar y leves rasgos dismórficos en Gillian sugieren una anomalía cromosómica. La sangre fue tomada para el análisis citogenético, pero el resultado (*Figura 2.9*) fue un cariotipo femenino normal, 46,XX. Debido a su particular combinación de rasgos clínicos, los genetistas sospecharon que Gillian podría tener el síndrome Di George-velo-cardio-facial (VCFS) que es causado por una microdeleción en el cromosoma 22q11. Como se describe en el *Cuadro 2.4*, la deleción Di George-VCFS es demasiado pequeña para ser vista al microscopio. Por ello se solicitó un test molecular. El test y su resultado están descritos en el *Capítulo 4*.

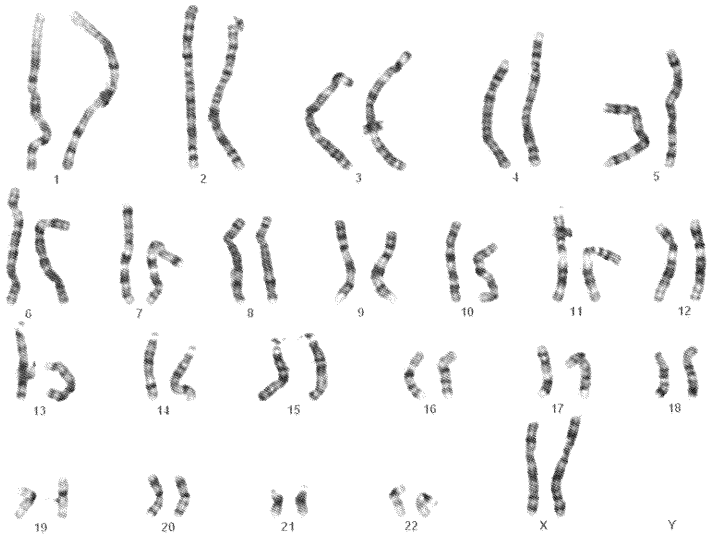


Figura 2.9 – Cariotipo de Gillian Green.
El resultado (a esta resolución) muestra un cariotipo femenino normal, 46,XX.

CASO 8 | Familia Howard | 26 | **38** | 68 | 100 | 275 | 376

- Helen, hija recién nacida de Henry y Anne (33 años)
- Síndrome de Down
- ¿Riesgo de recurrencia si tienen más niños?

El diagnóstico clínico de síndrome de Down en Helen fue confirmado por el cariotipo. Se tomó una muestra de 2 ml de sangre y, como aparece en la *Figura 2.4*, las células fueron cultivadas durante 48 horas, extendidas en un portaobjetos de microscopio y teñidas con bandas-G. El citogenetista analizó 10 células al microscopio (una de ellas se muestra en la Figura 2.10), y para realizar un cariotipo empleó un programa de análisis de imágenes para ordenar los cromosomas de una célula (*Figura 2.11*). Su informe describió el cariotipo como 47,XX,+21, confirmando que Helen tenía el típico síndrome de Down, trisomía 21. Otra razón para estudiar el cariotipo de Helen se discute en la *Sección 2.4*.

El árbol genealógico no mostró nada relevante (no niños anormales o abortos de repetición) en ningún miembro de la familia de Anne o de Henry.

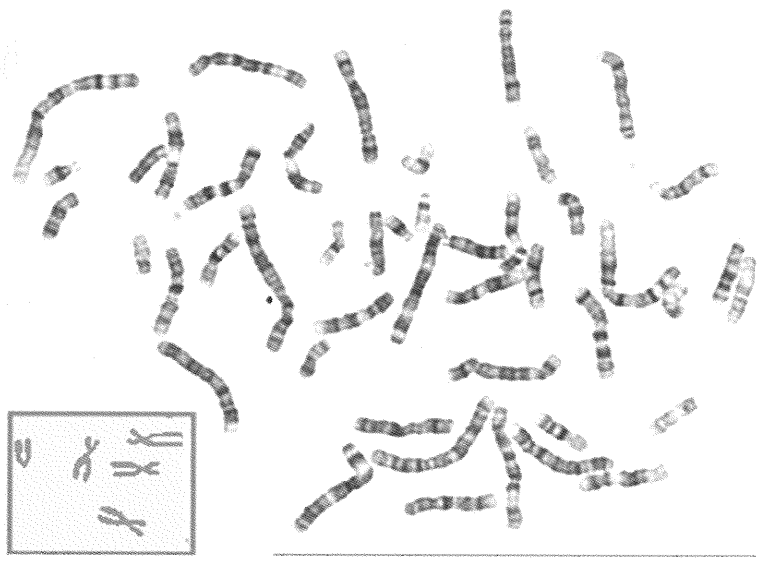


Figura 2.10 – Extensión 47,XX,+21.
Hay tres copias del cromosoma 21. Nótese que los cromosomas homólogos (los dos números 1, etc.) se comportan de forma independiente en la mitosis. El método empleado para la preparación deja las dos cromátidas hermanas de cada cromosoma unidas; por ello, la posición del centrómero no es visible al ojo. Esto hace el patrón de bandas más fácil para que el citogenetista los reconozca. El recuadro muestra algunos cromosomas que ha sido tratados de forma diferente, para hacer la estructura de las cromátidas hermanas unidas por el centrómero más obvias.

Su primera pregunta fue por qué había pasado, y por qué a ellos. El consejero explicó que fue un accidente en la meiosis (ver *Figura 2.12*). O los dos cromosomas 21 (en la primera división meiótica), o las dos cromátidas hermanas de una copia del 21, en la segunda división meiótica habían fallado en la separación en anafase y en la segregación en las dos células hijas separadas.

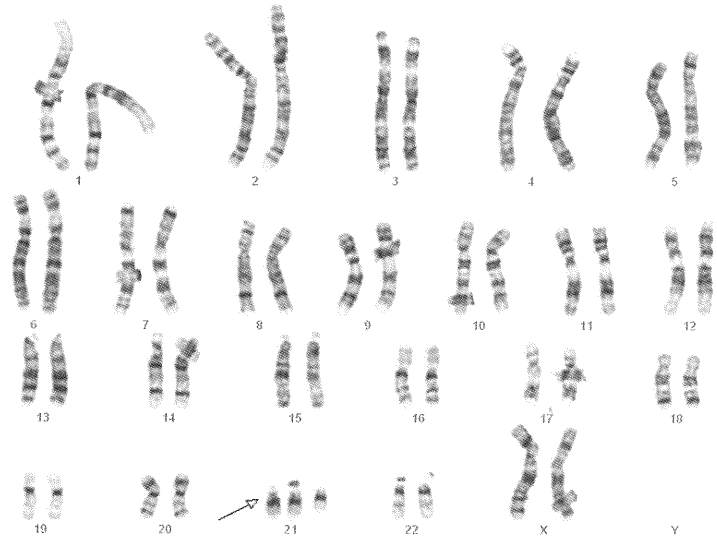


Figura 2.11 – Cariotipo que muestra la trisomía 21 (47,XX,+21).

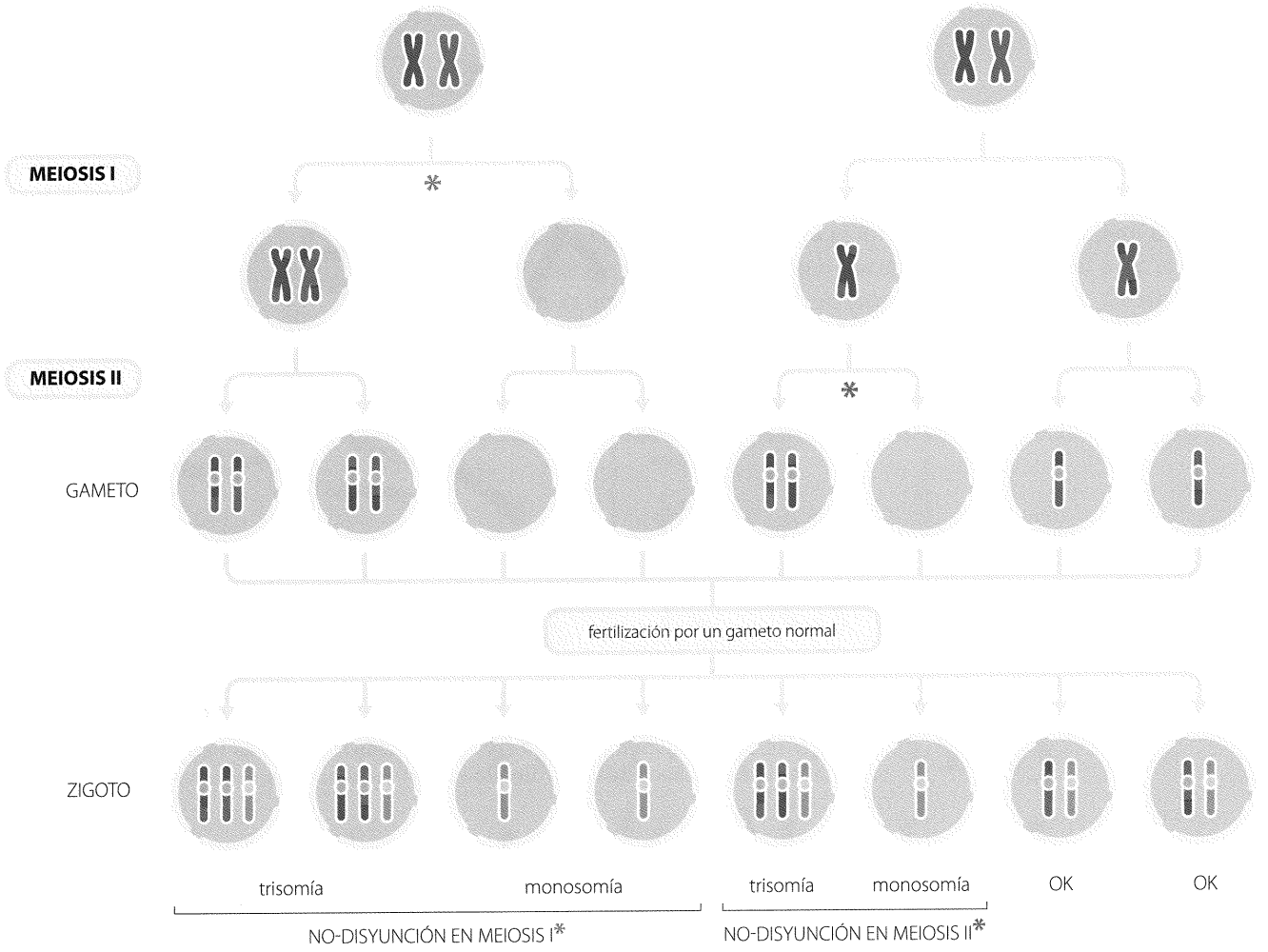


Figura 2.12 – Efecto de no-disyunción en meiosis.
La no-disyunción mostrada implica solo a un par de cromosomas (meiosis I) o a un único cromosoma (meiosis II); el resto de cromosomas (no se muestra) se separan y se segregan normalmente.

Ambos han acabado en la misma célula hija, produciendo un óvulo o un espermatozoide con 24 cromosomas, incluyendo dos copias del número 21.

Anne preguntó si era siempre culpa de la mujer, como había oído. No; en primer lugar, no hay nadie culpable y en segundo lugar, una no-disyunción puede suceder en cualquiera de las divisiones de la meiosis y en cualquiera de los padres, aunque estudios con ADN marcador muestran que el 70% de los casos podrían deberse a no-disyunciones en la primera división meiótica de la madre. Puede ser por la larga duración de esta etapa en la mujer, desde antes de nacer hasta cuando el óvulo pertinente es ovulado. En los hombres, la meiosis se realiza continuamente en los testículos, desde la pubertad hasta una edad avanzada. El riesgo individual aumenta de modo drástico con la edad de la madre (*Tabla 2.1*), pero como la mayoría de los niños nacen de madres jóvenes, muchos niños con síndrome de Down nacen también de madres jóvenes. Esto lleva a la discusión sobre el cribado poblacional en el *Capítulo 11*.

Tabla 2.1 – Riesgo de síndrome de Down *versus* edad materna

Edad (años)	20	30	34	36	38	40	42	45
Riesgo	1 de 1500	1 de 900	1 de 500	1 de 300	1 de 200	1 de 100	1 de 60	1 de 30

Con la excepción del síndrome de Turner (45,X), todas las anomalías numéricas vistas en el *Cuadro 2.3* muestran similar dependencia de la edad.

Posteriormente, Anne y Henry pidieron una cita para discutir la opción del diagnóstico prenatal en posteriores embarazos. Esto lleva a la discusión e intervención descritas en el *Capítulo 4*.

CASO 9 | Familia Ingram | 26 | **41** | 68 | 102 | 182 | 376

- Isabel, primera hija de Ian e Irene
- Talla baja a pesar de la altura de los padres
- ? Síndrome de Turner

Como se describió anteriormente, aunque Isabel tuvo algunos leves rasgos anormales al nacer, solo requirió atención médica porque era pequeña comparada con la altura de sus padres y su grupo de edad. Su historia y su fenotipo con las manos y pies hinchados fueron altamente sugestivos de síndrome de Turner. Esto se confirmó con el análisis cromosómico (*Figura 2.13*). Es la única monosomía que no es letal en las primeras etapas del desarrollo. Como los hombres viven solo con un cromosoma X, quizá no sea una sorpresa que el síndrome de Turner no siempre sea letal. Pero el hecho es que es letal en el 90% de los casos. Los fetos con síndrome de Turner pueden estar enormemente hinchados de líquido y la mayoría de los casos abortan de forma espontánea. Los que sobreviven nacen frecuentemente con pies y manos hinchadas (edematosas) y piel redundante en el cuello, con presencia de restos del edema fetal.

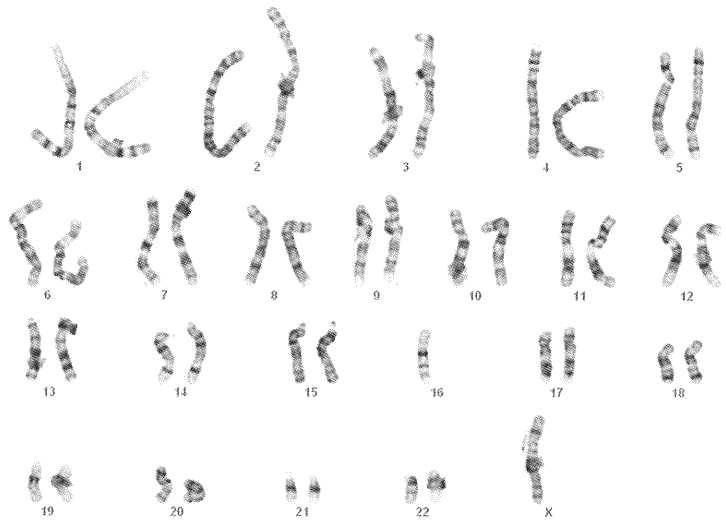


Figura 2.13 – Cariotipo de Isabel Ingram.
A pesar de que Isabel no podrá tener hijos, los tratamientos con estrógenos pueden permitirle un desarrollo normal de sus caracteres sexuales secundarios y una vida placentera. La moderna tecnología reproductiva podría permitir a algunas pacientes con síndrome de Turner tener hijos utilizando óvulos de donantes. Los tratamientos con la hormona del crecimiento podrían hacer incrementar la altura final.

A diferencia del resto de trisomías, el riesgo de síndrome de Turner no aumenta con la edad materna. El mecanismo es diferente. Más que una no-disyunción, es el resultado de un retraso en la anafase, en la que uno de los cromosomas sexuales se mueve demasiado despacio hacia uno de los extremos de la célula hija durante la división celular y acaba fuera del núcleo, y este se destruye. Puede producirse durante la gametogénesis o después de la concepción durante las primeras divisiones meióticas. Muchas mujeres Turner son mosaicos (ver *Sección 1.4*, y continuación), y pueden ser cualesquiera de estos dos mosaicos 45,X/46,XX o 45,X/46,XY. Cuando hay tejido XY en las gónadas, este tiene propensión a convertirse en maligno, y por ello es mejor que las gónadas se extirpen.

- Abortos
- Padres Elmer y Ellen, lactante femenino (Elizabeth) muy pequeña, dismórfica
- Anomalías cardíacas
- Sangre tomada para análisis cromosómico
- El árbol genealógico sugiere una enfermedad autosómica dominante con penetrancia reducida

Previamente se había visto que la lactante Elizabeth tenía múltiples anomalías complejas (*Figura 1.5*). Esto sugirió que tendría un desequilibrio cromosómico, pero no permitía a los citogenetistas suponer qué cromosomas podrían estar implicados. Ellen había tenido una aborto previo, que en sí mismo no es importante, pero era de notar que su hermana también había tenido dos abortos. Más investigaciones revelaron una historia familiar de problemas reproductivos; el árbol genealógico se muestra en la *Figura 1.11*. La sangre fue tomada del bebé y de los padres para el análisis cromosómico. El resultado fue:

- Elmer: cariotipo masculino normal, 46,XY.
- Ellen: traslocación equilibrada entre los cromosomas 1 y 22 (*Figura 2.14*)
- Elizabeth: producto de una segregación desequilibrada (*Figura 2.15*).



Figura 2.14 – Cariotipo con bandas-G de los cromosomas de Ellen.
Hay una traslocación equilibrada. Los cromosomas 1 y 22 han intercambiado segmentos (flechas). La traslocación se describe como 46,XX,t(1;22)(q25;q13).

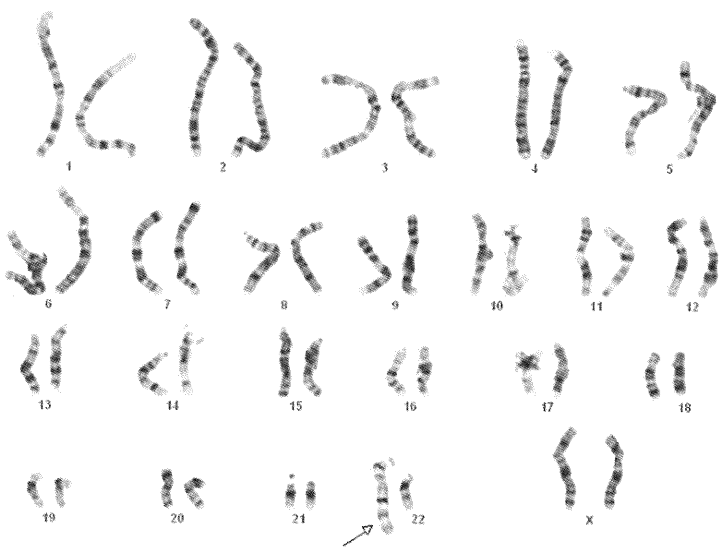


Figura 2.15 – Cariotipo con bandas-G de la lactante Elizabeth.
La niña ha heredado el cromosoma 1 normal de Ellen y su cromosoma 22 traslocado (flecha). Es trisómica para la porción del cromosoma 1 distal a 1q25, el punto de rotura de la traslocación, y monosómica para la parte del cromosoma 22 distal a 22q13.

Cuando recibieron los resultados, los padres estuvieron muy nerviosos y querían conocer las consecuencias para Elizableth, pero también cómo y por qué había pasado. Los citogenetistas dieron a la familia una explicación con un lenguaje familiar y explicándoles los términos técnicos.

Ellen era portadora de una traslocación constitucional equilibrada, es decir, estaba presente en todas las células de su cuerpo (ver a continuación la discusión de anomalías equilibradas *versus* desequilibradas). La traslocación había estado presente en el óvulo fecundado desde que Ellen inició su desarrollo, y el árbol genealógico señalaba que ya estaba presente en alguno de los abuelos maternos de Ellen. En algún momento, en esa persona o alguno de los antepasados más lejanos, los cromosomas 1 y 22 se rompieron. Las roturas cromosómicas son sucesos frecuentes, pero las células tienen maquinaria para repararlas; por ello la mayoría son inadvertidas. En este caso dos roturas simultáneas han generado cuatro bordes rotos, con la mala suerte de que la maquinaria de reparación los ha unido de forma errónea (*Figura 2.16*). Por otra parte, quizá la traslocación podría haber sido producida por la maquinaria responsable de la recombinación genética durante la meiosis, activándose inapropiadamente cortando y uniendo cromosomas no emparejados en las células de la línea germinal. Dado que cada uno de los cromosomas derivados tienen un único centrómero, la mitosis se produjo sin problemas y no hubo efectos fenotípicos.

Aunque todas las células de Ellen pudieron pasar a través de la mitosis sin problema, la meiosis fue un tema diferente. En la primera división de la meiosis, los segmentos de los cromosomas homólogos se emparejan (*Figura 2.7*). En este caso, el emparejamiento podría producir una estructura de forma cruzada conteniendo cuatro cromosomas enteros: un tetravalente. Cuando las fibras

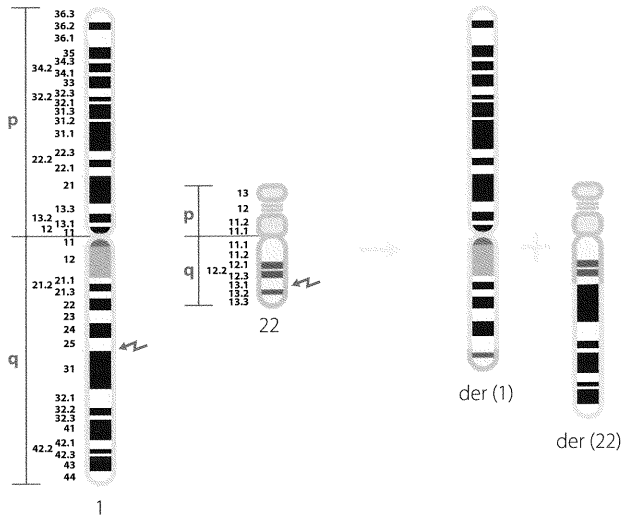


Figura 2.16 – Cómo se originó la traslocación 1;22 en Ellen Elliot.
Los cromosomas 1 y 22 se rompen en los puntos que señalan las flechas, y la maquinaria de reparación del ADN de las células une los bordes formando dos cromosomas derivados como se muestra. Los cromosomas derivados son nombrados como der(1) y der(22).

del huso atraigan los centrómeros y los separen aparte, podrían segregarse de varias formas (*Figura 2.17*). Podrían producir gametos enteramente normales, gametos portadores de la traslocación equilibrada, o varias formas desequilibradas, una de las cuales había producido Elizabeth. El bebé tenía trisomía parcial del cromosoma 1 y, simultáneamente, monosomía parcial del cromosoma 22. El desequilibrio genético resultante fue la causa de sus anomalías.

Hay un aumento de riesgo en futuros embarazos, que pueden tener varias formas dependiendo del modo en que se segregaron los cromosomas traslocados. El resultado podría ser otro niño con los mismos problemas que Elizabeth, o de un patrón de segregación diferente podría resultar un niño con un conjunto diferente de anomalías; quizás el resultado podría ser tan grave como para producir un aborto, o podrían esperar tener suerte y tener un bebé normal. Todas estas posibles consecuencias se pueden observar en otros miembros de la familia en el árbol genealógico (*Figura 1.11*). El riesgo era importante, pero no es fácilmente cuantificable por muchas razones:

- no podemos predecir la probabilidad exacta de que los cromosomas traslocados puedan segregarse en alguna de las diferentes formas posibles.
- en algunas posibles consecuencias desequilibradas la concepción puede terminar en un aborto muy temprano, eludiéndose el problema.
- no es cuantificable que otros cariotipos desbalanceados menos fatales puedan acabar en aborto o en un bebé recién nacido anormal.

Si hubiera sido Elmer el portador de la traslocación el riesgo habría sido menor, porque es menos probable que los espermatozoides anormales ganen la carrera para fertilizar al óvulo. Si Elmer y Ellen quisieran, podrían analizarse los futuros embarazos y, si el feto tiene un cariotipo desequilibrado, ofrecerles interrumpir el embarazo. Los modos de hacerlo se discuten en el *Capítulo 14*.

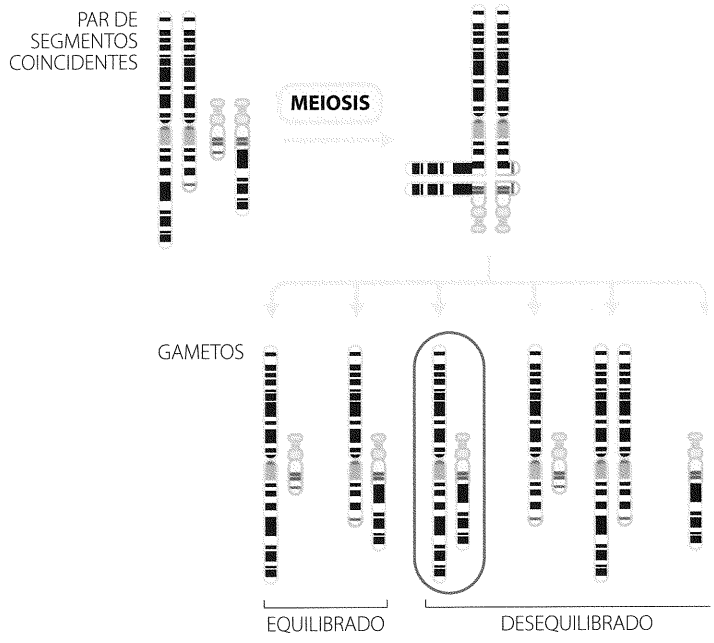


Figura 2.17 – Posibles modos en que los cromosomas de Ellen pueden segregarse en la primera división meiótica.
Durante la profase I los segmentos coincidentes de los cromosomas se emparejan, produciendo un tetravalente en forma de cruz que contiene las copias de los cromosomas 1 y 22 normal y traslocados. En la anafase I se separan, y el diagrama muestra posibles resultados. El gameto que dio origen al lactante Elliot está dentro de un círculo. También son posibles otros patrones de segregación más complejos (segregación 3:1).

Meses después, una vez que Elmer y Ellen empezaron a sobrellevar los problemas de salud de Elizabeth, y entendieron la información acerca de la traslocación y sus propios riesgos para futuros niños, la cuestión del riesgo familiar fue discutida. La historia familiar sugiere que el tío de Ellen y su hermana podrían ser portadores de la misma traslocación equilibrado, como su hermana más joven, quien todavía no estaba casada. El consejero genético les explicó que tenían que ser conscientes del riesgo, preferiblemente a través de Elmer y Ellen, quienes conversarían con ellos para tratar el tema. También les ofreció ver a los familiares y explicarles la situación y las opciones posibles, incluyendo analizarlos genéticamente. Es importante tratar a cada miembro de la familia por separado. La confidencialidad debe mantenerse y la información acerca de un miembro de la familia solo debe darse a otro con su permiso.

2.4. Resumen y ampliación

¿Qué son los cromosomas?

Los cromosomas son empaquetamientos de ADN. Cada cromosoma contiene una larga e inmensa doble hélice de ADN, empaquetado por diversas proteínas. Entre ellas destacan cuatro tipos de histonas: H2A, H2B, H3 y H4, pero hay además otras muchas proteínas. Cromatina es el nombre genérico del complejo resultante ADN-proteína. La estructura básica de la cromatina es un collar de cuentas

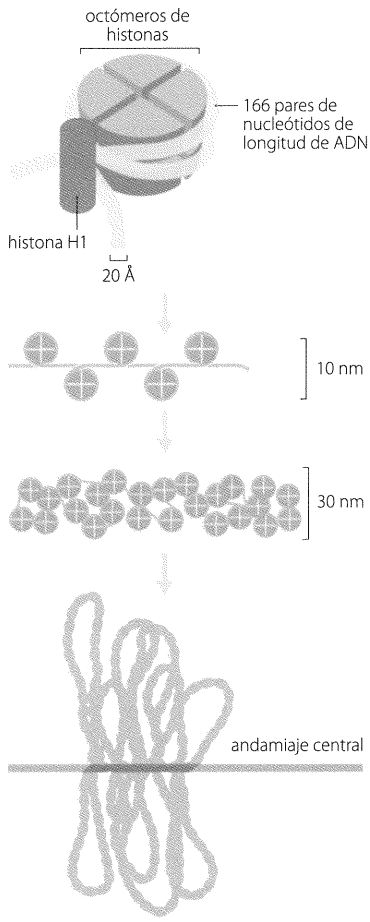


Figura 2.18 – Empaquetamiento del ADN en el cromosoma. Si se estira el ADN de un cromosoma como en la *Figura 2.9*, sería 10 000 veces la longitud del cromosoma. El ADN de los cromosomas existe como un complejo de proteína ADN llamado cromatina. El componente más básico del cromosoma es el nucleosoma, que está formado por aproximadamente 170 pb de doble hélice de ADN enrolladas alrededor de un octámero de proteínas de histonas. Este collar de cuentas está enrollado en un fibra de 30 nm, y después se coloca dando vueltas al andamiaje de proteínas del cromosoma.

(*Figura 2.18*). El collar es el ADN y las cuentas se denominan nucleosomas. Un nucleosoma tiene un corazón casi esférico, formado por ocho histonas moleculares, con 1,75 vueltas de ADN enrollado a su alrededor, y una novena molécula de histona en el exterior. La cromatina forma grandes bucles, anclando sus bases al andamiaje de proteínas que forman la médula de los cromosomas.

Además de esta estructura básica, existen múltiples configuraciones alternativas de la cromatina, según el alargamiento del ADN y de qué está haciendo la célula. La mayoría del tiempo el collar de cuentas está enrollado en una fibra de 30 nm. El nucleosoma puede estar suelto o fuertemente empaquetado, dependiendo de si los genes han sido expresados o no en este alargamiento de ADN (ver *Capítulo 3* para una descripción de la transcripción). Cuando las células se están dividiendo la cromatina está fuertemente empaquetada y los cromosomas pueden verse en el microscopio (*Figura 2.10* y *Figura 2.11*). Los cromosomas, también están presentes en las células en interfase, pero no pueden ser vistos al microscopio porque las fibras de cromatina de 30 nm son demasiado delgadas.

Anomalías cromosómicas numéricas estructurales

Las anomalías cromosómicas pueden ser **numéricas** (número erróneo de cromosomas, p.e., Helen Howard (*Figura 2.11*), Isabel Ingram (*Figura 2.13*) y los ejemplos del *Cuadro 2.3*) o **estructurales**, cuando uno o más cromosomas contienen el ADN equivocado, como con Ellen Elliot (*Figura 2.14*).

Anomalías numéricas

Hay dos tipos:

- **Errores de ploidía**, son errores donde hay un número erróneo de "juegos" de cromosomas. Las células normales son diploides ($2n$ = 46 cromosomas). Los gametos son haploides (n = 23). Ocasionalmente, dos espermatozoides fertilizan un óvulo, produciendo una triploidía ($3n$ = 69). Las triploidías también se pueden producir por fallos en el proceso meiótico, resultante de un gameto diploide que después fertiliza a un gameto normal haploide. Como se menciona en el *Cuadro 2.3*, la triploidía en humanos es un error frecuente de la concepción, pero los triploides no llegan a término. Las tetraploidías se producen cuando una célula replica su ADN pero después no se divide. Las tetraploidías y los grados más altos de ploidías (poliploidías) pueden ser vistas en células individuales, pero no en toda la persona.
- **Aneuploidías.** Todas las anomalías vistas anteriormente afectan a células con juegos de cromosomas completos, las cuales se llaman **euploides. Aneuploides** son las células que tienen pérdida o ganancia de un solo cromosoma. Las células o personas con un cromosoma extra o perdido son trisómicas o monosómicas. Tetrasomías y nulisomías también son posibles. Los de las aneuploidías problemas clínicos son discutidas en el *Capítulo 7.*

Anomalías estructurales

Estas incluyen:

- **Traslocaciones recíprocas.** Se producen cuando dos cromosomas intercambian segmentos no-homólogos (ver *Figura 2.16*). Un portador

de una traslocación recíproca equilibrada tiene el riesgo de producir descendientes con trisomía de uno de los segmentos traslocados y, al mismo tiempo, monosomía de otro (*Figura 2.17*). Este fue el problema en el Caso 5 (familia Elliot).

- **Traslocación robertsoniana.** Implica una traslocación entre dos cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21, 22) con los puntos de rotura en el extremo de los brazos cortos, justo encima del centrómero (*Figura 2.20*). Un portador de una traslocación robertsoniana tiene riesgo de tener fetos con alguna trisomía completa o monosomía de uno de los cromosomas implicados. Por ejemplo, alguien portador de una traslocación robertsoniana implicando al cromosoma 21 tiene el riesgo de producir un niño con trisomía 21. Alrededor del 3-4% de los niños con síndrome de Down se deben a tal traslocación. Fenotípicamente este niño será indistinguible de otro niño con síndrome de Down, pero el riesgo de recurrencia es mucho mayor. Esta es una razón adicional por la que a Helen Howard (Caso 8) se le hizo el cariotipo, aunque había pocas dudas en el diagnóstico de síndrome de Down.
- **Deleciones** pueden ser intersticiales o terminales; se sabe que los cromosomas deben tener siempre telómeros, por lo que una deleción terminal estable debe de haber adquirido de algún modo un telómero. Los cromosomas en anillo (ver *Figura 2.19*) son un tipo especial de deleción terminal. Las deleciones tienen generalmente efectos graves, y las deleciones grandes son letales.
- **Duplicaciones** normalmente tienen efectos menos graves que las deleciones correspondientes.
- **Inversiones** pueden ser de diferente tamaño. Si implican al centrómero (inversión pericéntrica) cambian la forma total del cromosoma; si no (inversión paracéntrica) solo pueden detectarse mediante un examen cuidadoso del patrón de bandas.

Anomalías equilibradas y desequilibradas

- Una anomalía cromosómica es descrita como **equilibrada** si no hay material extra o perdido: el ADN se ha dividido en paquetes incorrectos. Dado que cada cromosoma tiene un solo centrómero y sus propios telómeros, una anomalía equilibrada no interfiere en la habilidad de la célula para entrar en mitosis. Así, un óvulo fecundado con una anomalía equilibrada podría ser capaz de desarrollar un adulto normal. Ellen Elliot (*Figura 2.15*) es un ejemplo de persona que tiene una anomalía cromosómica equilibrada pero es fenotípicamente normal. Las traslocaciones robertsonianas se consideran equilibradas a pesar de que los brazos cortos de los dos cromosomas acrocéntricos se han perdido (*Figura 2.20*), porque no tiene efectos en el fenotipo de los portadores, y los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos restantes suplen todas las funciones de los dos perdidos.
- Si hay material patogénico extra o perdido, la anomalía es **desequilibrada**. La palabra "patogénica" se emplea aquí porque recientes investigaciones han dado la vuelta a la antigua visión de que está fijada la cantidad

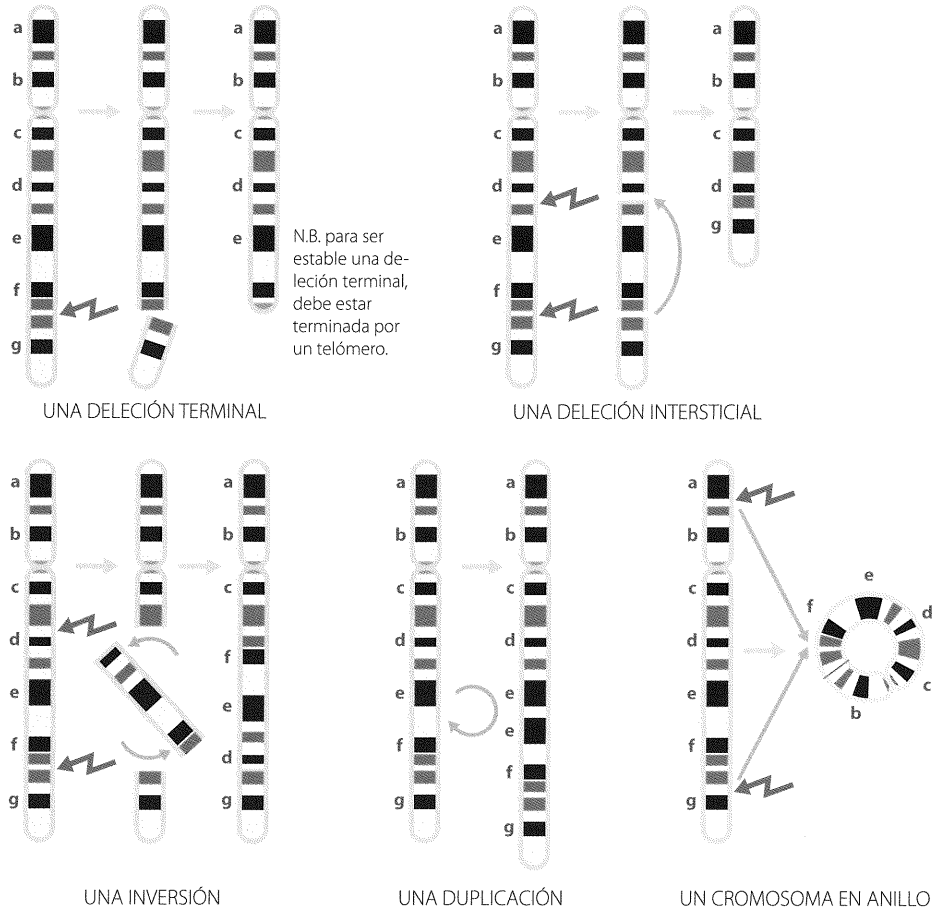


Figura 2.19 – Anomalías cromosómicas estructurales.
Éstas pueden aumentar por roturas cromosómicas y errores en la reparación o bien por una función inapropiada de la maquinaria genética de recombinación. Para traslocaciones ver *Figura 2.16* y *2.20*.

exacta de material cromosómico en los humanos. Algunos segmentos de ADN están frecuentemente ausentes o duplicados en personas normales (también llamados polimorfismos de gran número de copias). Alguna de estas variantes no podría describirse como desequilibrada. Sin embargo, la mayor parte de nuestro ADN tiene que estar presente en la cantidad exacta y Hellen Howard (*Figura 2.11*) y Elizabeth Elliot (*Figura 2.15*) son ejemplos de los problemas de las anomalías cromosómicas desequilibradas.

Las anomalías cromosómicas empiezan a ser importantes en meiosis cuando los cromosomas homólogos se aparean. Las cosas pueden ir a peor de dos formas:

- Los cromosomas traslocados tienen segmentos derivados de más de un cromosoma original. Durante la profase y la meiosis I se aparearán de múltiples maneras, formando trivalentes y cuadrivalentes en lugar de bivalentes (asociación de los dos homólogos). Ellos son los responsables de la segregación incorrecta en anafase (*Figura 2.17*).

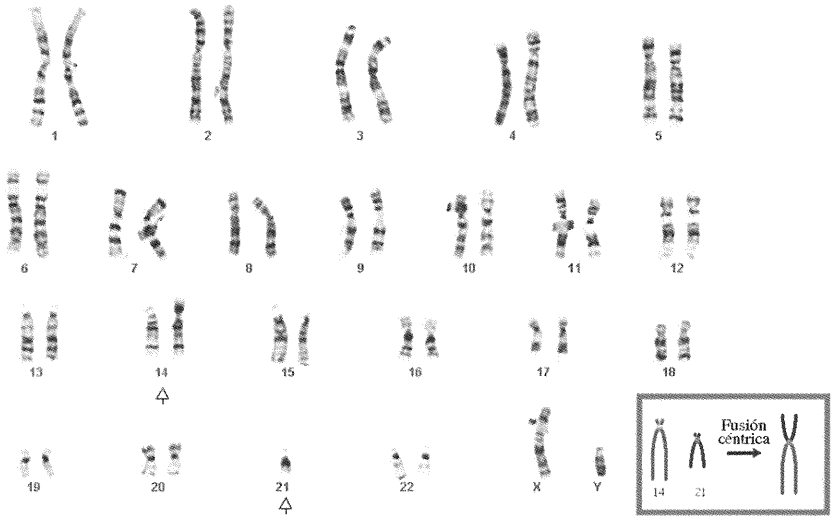


Figura 2.20 – Una traslocación robertsoniana.
El recuadro muestra cómo se produce este tipo común de anomalía cromosómica. El brazo corto de todos los cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21, 22) contiene ADN similar. Una inapropiada combinación entre dos cromosomas no homólogos produce la fusión de cromosomas, que funcionan como un solo cromosoma en mitosis. El pequeño fragmento acéntrico situado en el final de los brazos cortos se pierde.

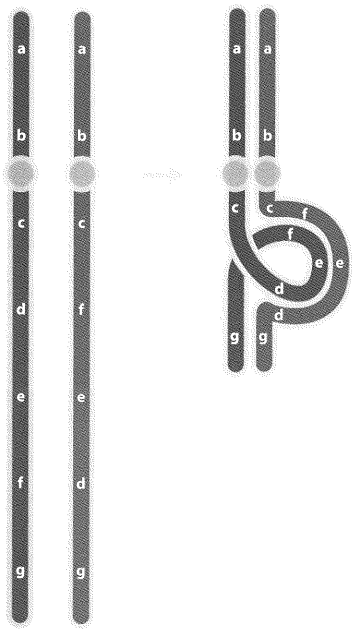


Figura 2.21 – En la meiosis I se emparejan los segmentos de pares de cromosomas. Si un cromosoma tiene una inversión comparado con su homólogo, suelen formar una estructura en bucle.

- Los cromosomas con inversión se emparejan formando una estructura en bucle, pero si el intercambio se produce dentro de la vuelta los cromosomas recombinantes son anormales (ver también *Ejercicio 4*).

Aunque las anomalías equilibradas no afectan al fenotipo de las personas, hay excepciones.

- Uno o más puntos de rotura pueden cortar por la mitad a un gen. Esto podría impedir que el gen trabajara, lo cual puede o no afectar al individuo. El Caso 12 (familia Lauton) del *Capítulo 4* es un ejemplo de que esto ocurrió.
- Algunas veces, como se describe en el *Capítulo 3*, un punto de rotura no interrumpe el gen en sí mismo, pero separa un gen del elemento de control, localizado en algún lugar lejano en la misma cadena de ADN. De nuevo, puede impedir que el gen trabaje.
- Ocasionalmente, cuando una recombinación mal colocada o reparación de ADN une segmentos de diferentes cromosomas, la unión crea un nuevo gen con parte de dos genes que estaban localizados cerca de los puntos de rotura de diferentes cromosomas. Algunos genes quiméricos son importantes en el cáncer (*Capítulo 12*).
- Finalmente, una traslocación equilibrada X-autosoma causa especiales problemas por la inactivación del X. Esto se discute en el *Capítulo 7*.

Anomalías constitucionales y mosaicos

Las anomalías cromosómicas pueden ser:

- **constitucionales** (presentes en todas las células)
- **mosaicos** (presentes solo en algunas células)

Los mosaicos ya han sido discutidos en el *Capítulo 1* en conexión con el Caso 9 (Familia Ingram, síndrome de Turner). Siempre es el resultado de un suceso post-cigótico, cuando una persona o embrión consta de más de una célula. Dado que el mosaicismo depende de sucesos post-cigóticos, el riesgo de recurrencia para los padres de un niño mosaico es insignificantemente bajo; sin embargo, si el mosaicismo se extiende a las células germinales de una persona, el riesgo para su hijo o hija es substancial. Estas consideraciones introducen algunas incertidumbres en el consejo genético, porque sea o no detectada una anomalía cromosómica, es imposible formalmente excluir el mosaicismo (no se puede examinar todas las células de una persona) y los cromosomas de la línea celular germinal solo pueden ser estudiados a través de los efectos en los hijos de esa persona.

Las personas pueden ser mosaicos para las enfermedades monogénicas o para una anomalía cromosómica, pero históricamente la discusión clínica más relevante de los mosaicos está enfocada en los mosaicismos cromosómicos. Esto se debe a que las técnicas para estudiar los cromosomas están disponibles desde hace 40 años, mientras que el estudio de mosaicismos para una mutación puntual requiere tests moleculares de los que solo se dispone recientemente. Los citogenetistas, cuando analizan los cromosomas de un paciente, miran muchas células y frecuentemente encuentran mosaicismos. Cualquier anomalía cromosómica (excepto la triploidía) puede surgir de forma constitucional a través de errores meióticos y pueden aparecer los mosaicismos a través de errores mitóticos. Así, por ejemplo, es bien conocido el mosaicismo del síndrome de Down. El fenotipo estará en algún punto de un espectro entre normal y síndrome de Down completo, pero exactamente donde es impredecible porque depende de la proporción de células trisómicas en los diferentes tejidos y órganos. Además, muchas anomalías que son letales si están presentes de forma constitucional pueden sobrevivir en mosaico. Por ejemplo, un paciente puede tener una trisomía 8 en mosaico, pero es improbable que tenga la trisomía completa de forma constitucional.

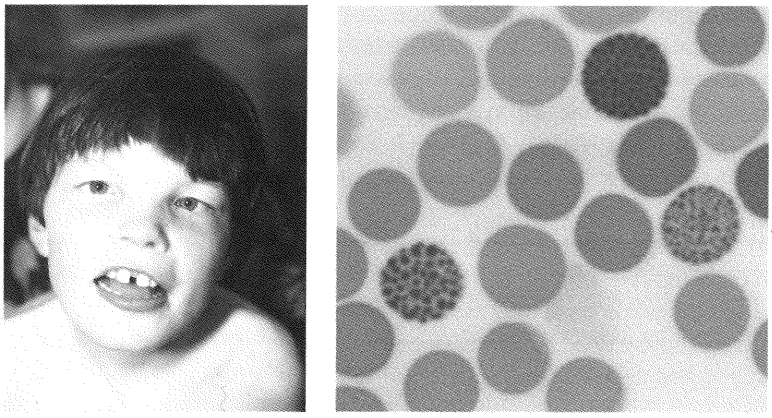
Algunas veces los mosaicos se presentan solo en algunos tejidos; por ejemplo, el mosaico tetrasomía 12p (cuatro copias del brazo corto del cromosoma 12; las dos copias extras están en forma de un pequeño cromosoma metacéntrico adicional) causa el síndrome Pallister-Killian (OMIN 601803), en el que los individuos afectados tienen un aspecto característico y un patrón de malformaciones. Pero las células anormales se ven sólo en la piel y no en muestras de sangre estándar; esto parece que es porque en la sangre, en la que la renovación es más rápida, las células anormales están en desventaja y las células normales predominan. El mosaicismo limitado a un tejido puede ser un problema en el diagnóstico prenatal. El procedimiento de biopsia de vellosidad corial (*Capítulo 14*) proporciona al citogenetista una muestra de la placenta para su análisis. Aunque la placenta es tejido fetal, si muestra mosaicismo hay una gran incertidumbre respecto a si este puede estar confinado a la placenta o si el feto en sí mismo también es mosaico, lo que puede tener implicaciones para el embarazo.

Cuadro de enfermedad 2

Talasemia alfa/síndrome de retraso mental: una enfermedad de la cromatina

La talasemia alfa (OMIM 301040) es el resultado de una deficiencia del componente de la α-globina. Un déficit completo causa hidropsia fetal letal, mientras que un déficit parcial causa enfermedad HbH con microcitosis y hemolisis. La talasemia alfa afecta a millones de personas de las regiones del mundo con malaria, especialmente en el sureste de Asia. Está causada por una deleción o, en algunas ocasiones, una mutación puntual de los genes α-globina en el cromosoma 16p. La asociación con la malaria se discute en el *Capítulo 6*. Entre la población indígena en regiones sin malaria es extremadamente rara.

Durante los ochenta fueron recogidos un número de casos de nativos europeos del norte que tenían talasemia (enfermedad HbH) y retraso mental. El retraso mental no es un rasgo común de la talasemia. En el estudio, se demostró que muchos de estos individuos tenían largas deleciones en el cromosoma 16p que afectaban al gen de la α-globina, y presumiblemente a otros genes cuya pérdida podría explicar el retraso mental (ver OMIM 141750). Sin embargo, otros casos afectados no tenían ninguna anomalía identificable del cromosoma 16. Además, estos pacientes eran siempre hombres; algunas veces estaban afectados familiares masculinos, sugiriendo un patrón de herencia ligado al X y tenían una cara de aspecto peculiar (véase fotografía). La enfermedad HbH, aunque presente, solía ser leve y solo detectable por pruebas de laboratorio. Las personas afectadas con frecuencia tenían otros rasgos, que incluían la inversión sexual masculino-femenino. El mapeo genético y la clonación posicional (como se describe en el *Capítulo 9*) eventualmente permite la identificación de la mutación en un gen llamado ATRX en el cromosoma X en Xq13.



(a) (b)

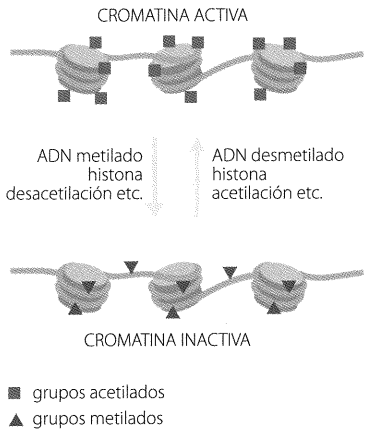
Un paciente con ATRX. Reproducción de *J. Med. Genet.* 1991; **28**: 742-745 con permiso de BMJ Publishing Group. (b) Linfocitos en un paciente de ATRX que muestran las características inclusiones. Foto cortesía del Dr. Richard Gibbon, Oxford.

¿Cómo puede una mutación en un gen del cromosoma X producir talasemia, junto con un amplio rango de otros síntomas? Con la evidencia de su secuencia de aminoácidos, la proteína ATRX es un miembro de una larga familia de proteínas, las SW12/SNF, que regulan la expresión de genes y el comportamiento de los cromosomas a través de los efectos en la estructura de la cromatina. Como se explicó anteriormente, el ADN es empaquetado siendo enrollado alrededor de un octámero de proteínas de histonas que forman un nucleosoma. El collar de octámeros es objeto de más niveles de empaquetamiento, bajo el control de otras numerosas proteínas. Hay dos configuraciones básicas de la cromatina:

Cuadro de enfermedad 2 - *Continuación*

- la heterocromatina está fuertemente empaquetada y los genes en la heterocromatina no se expresan.
- la eucromatina es más abierta y variable; los genes en la región eucromática de los cromosomas pueden ser expresados o no.

ATRX es una helicasa, es decir, una proteína que puede desenvolver la doble hélice de ADN. Se cree que forma parte de un gran complejo de multiproteínas que controlan la estructura local de la cromatina. Esto da la vuelta al control de la expresión de los genes en el empaquetamiento del ADN. ATRX está particularmente asociada con los centrómeros, los cuales tienen la estructura represiva heterocromática. Otras regiones locales de heterocromatina también pueden formar estas estructuras represivas, excluyendo la expresión de los genes en respuesta a las señales acerca del estado metabólico de la célula. ATRX está implicado probablemente en el establecimiento o mantenimiento de las estructuras de la cromatina represivas.



ATRX es un ejemplo de **enfermedad de la cromatina**. Otros ejemplos incluyen el síndrome ICF (ver OMIM 242860) y síndrome de Rett (ver *Cuadro de enfermedad 7*). Estas enfermedades tienen mutaciones en genes que codifican proteínas que controlan la estructura de la cromatina y por ello tienen efectos en la expresión potencialmente de gran número de genes. Con nuestro estado actual de conocimiento, no es posible predecir qué genes van a estar afectados por un defecto dado, o que fenotipo clínico podría resultar. A pesar de todo, estas enfermedades nos abren una ventana en la importante función de los cromosomas. Ellas nos muestran que estos son mucho más que un vehículo para dividir el genoma entre las células hijas durante mitosis y meiosis. A través de las variaciones locales de la estructura de la cromatina, los cromosomas proporcionan un ambiente dinámico para regular cómo son expresados los genes.

La cromatina tiene una estructura altamente dinámica. Los complejos de remodelacón de la cromatina, de los cuales la proteína ATRX es un componente, constantemente varían los nucleosomas a lo largo del ADN, exponiendo los sitios para una modificación selectiva del ADN y las histonas. La cromatina activa e inactiva está marcada por diferentes patrones de metilación del ADN (ver figura) y por una variedad de modificaciones de las histonas, incluyendo acetilación, metilación y fosforilación de sitios específicos.

2.5. Referencias

Gardner RMJ y Sutherland GR (1996) *Chromosome Anormalities and Genetic Conseling,* 2ª edición OUP, Oxford. *Profundiza en el material tratado en este capítulo.*

Shaffer LG y Tommerup N, eds. (2005) *ISCN 2005, An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.* S. Kargen AG, Basel.

Más detalles de mitosis y meiosis se pueden encontrar en cualquier libro de biología.

Páginas web útiles

Una página web útil de información es la Online Biology Book por MJ Farabee (ver los capítulos de meiosis y mitosis):
http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/BIOBK/BioBookTOC.html

La página web de Hironao Numabe de Universidad Médica de Tokio contiene (en lengua inglesa) gráficos y animaciones relevantes para este capítulo:
http://www.tokyo-med.ac.jp/genet/index-e.htm

2.6. Ejercicios de autoevaluación

(1) Qué división meiótica, por una no-disyunción, en alguno de los padres produce potencialmente un niño con:
(a) 45,X [*ver Guía de los ejercicios de autoevaluación*]
(b) 47,XXY
(c) 47,XYY

(2) Dibuje el tetravalente y los posibles gametos de la concepción de las siguientes traslocaciones:
(a) t(2;4)(q22;q32) [*ver Guía de los ejercicios de autoevaluación*]
(b) t(5;10)(p14;p13)
(c) t(7;9)(q32;p21)

(3) Usando los diagramas de tetravalentes que ha dibujado en la pregunta anterior, hacer un *cross-over* entre el cromosoma normal y el traslocado de cada uno de los segmentos apareados. Extraer las consecuencias. (*Esto no es para darle dolor de cabeza: es normal al menos un cross-over por brazo cronomosómico durante la meiosis.*)

(4) Considera un portador de una traslocación equilibrada Robertsoniana 14;21 cuyo cariotipo se muestra en la *Figura 2.20*. Durante la meiosis el cromosoma traslocado formará un trivalente con los cromosomas normales 14 y 21. Dibuja los posibles modos en los que pueden segregarse cuando se forma un gameto, y describe las consecuencias de cada uno de ellos para cada concepción.

(5) Extrae los posibles gametos y niños nacidos vivos que podría tener un portador de una traslocación equilibrada Robertsoniana 21;21 casado con una persona cromosómicamente normal.

(6) Considerando la inversión heterocigota mostrada en la *Figura 2.21*, extrae las consecuencias de un *cross-over* ocurrido dentro del bucle de la inversión o fuera. ¿Es diferente si el centrómero está dentro del segmento invertido (inversión pericéntrica) o fuera, como en la figura (una inversión paracéntrica)?

Capítulo **3**

¿Cómo funcionan los genes?

Conceptos y habilidades que aprenderá en este capítulo

Después de estudiar este capítulo será capaz de:

- Nombrar las bases, azúcares y nucleósidos que forman el ADN y el ARN normal, y hacer un esquema de la doble hélice de ADN, con sus parejas de bases y sus terminaciones 5′ y 3′.
- Dibujar un diagrama que muestre los principios (pero no la enzimología detallada) de la replicación del ADN, la transcripción, el procesamiento del tránscrito (*splicing*) y la forma en que las secuencias de ARNm concretan la secuencia de aminoácidos de un polipéptido.
- Describir las características generales de los genomas nucleares y mitocondriales.
- Esquematizar la estructura génica humana típica, mostrando exones, intrones, el promotor, los codones de inicio y parada, las regiones 5′ y 3′ que no se traducen y los sitios de *splicing*.
- Describir de manera resumida el papel del promotor, de los factores de transcripción y de la estructura de cromatina en la expresión del gen.

3.1. Historias clínicas

CASO 10 | Familia Johnson | **55** | 64 | 376

- Síndrome de Marfan

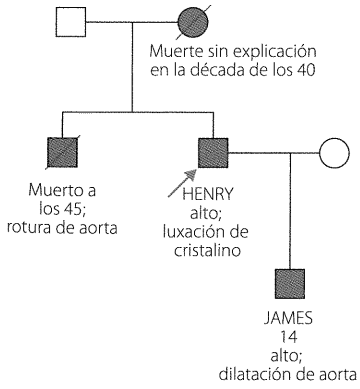
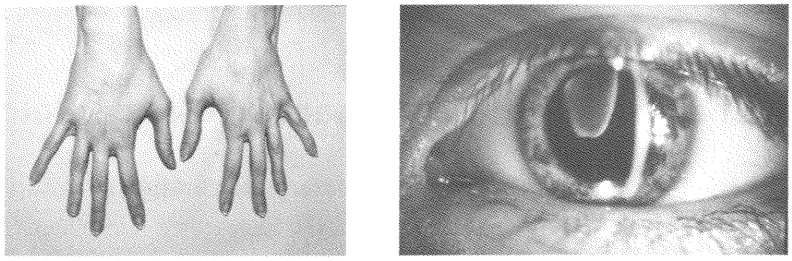


Figura 3.1 – Árbol genealógico de James Johnson.

La primera vez que James acudió a la consulta de genética tenía 14 años. Su padre, Henry, y algunos de sus parientes tenían historia clínica desde hacía años en el departamento de genética. En un principio fueron remitidos por un oftalmólogo que observó que Henry tenía luxación de cristalino y era bastante alto. El oftalmólogo se alarmó al descubrir que el hermano de Henry, a los 45 años, había muerto de manera repentina de una rotura aórtica y que su madre había fallecido sin explicación a una edad similar. Se realizó el diagnóstico de síndrome de Marfan y a Henry se le indicó que el 50% de su descendencia tenía riesgo de heredar esta enfermedad genética dominante. En aquel momento el gen responsable del síndrome no había sido identificado, y el diagnóstico se basaba en criterios clínicos muy bien definidos. Estos incluyen una historia familiar positiva y la implicación de sistemas que están normalmente afectados en el síndrome de Marfan (principalmente los sistemas esquelético, ocular y cardiovascular). Años más tarde, el médico buscó características clínicas del síndrome de Marfan utilizando el criterio Ghent (De Paepe *et al.*, 1996). El ecocardiograma mostraba una dilatación temprana de la aorta ascendente, además de que James era muy alto para su edad. El médico concluyó que estas

características y la historia familiar positiva no dejaban lugar a dudas. En ese momento el gen involucrado ya había sido descrito, pero solo con los criterios clínicos resultó obvia su afectación.



(a) (b)

Figura 3.2 – Síndrome de Marfan.
(a) Aracnodactilia (dedos largos). (b) Luxación de cristalino.

3.2. Antecedentes

El funcionamiento de los genes es el tema de dos famosas hipótesis. Ninguna de ellas es totalmente verdadera, pero resultan herramientas útiles.

- En la década de 1940, Beadle y Tatum propusieron que el trabajo de cada gen era dar lugar a una enzima específica (la **hipótesis de un gen-un enzima**). Esto no es completamente cierto porque muchos genes dan lugar a proteínas no enzimáticas y otros, a moléculas de ARN funcional en lugar de proteínas, pero la idea de un gen–un polipéptido sigue siendo la primera herramienta útil para pensar en lo que hacen los genes.
- Algunos años más tarde, Francis Crick definió la función esencial del ADN en el "Dogma Central" de la biología molecular (*Figura 3.3*). Los genes son las unidades funcionales del ADN, y la función común de un gen es dar lugar a la estructura de una proteína. Se cree que existen alrededor de 24.000 proteínas-genes codificantes en el genoma humano. El Dogma Central es útil, pero no absolutamente cierto. En ocasiones el flujo de información desde el ADN al ARN es inverso, cuando una enzima específica (la transcriptasa inversa) realiza una copia de ADN a partir de una molécula de ARN. Esta es una parte crítica del ciclo de vida de los virus de ARN, pero no es parte de la corriente principal del metabolismo en la

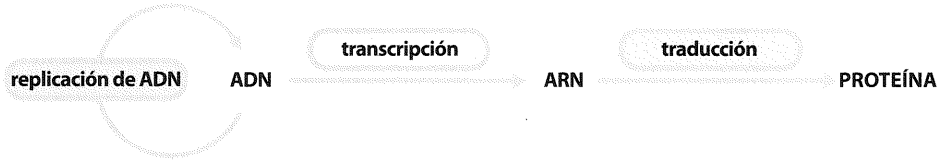


Figura 3.3 – Dogma Central de la biología molecular.
Las flechas no significan que el ADN se vuelva ARN, etc., sino que la información contenida en el ADN es transferida a la molécula de ARN, que a su vez transmite su información en una proteína. En otras palabras, los genes están constituidos por ADN, pero ejercen sus efectos a través de las proteínas. El ADN también da lugar a información en otras moléculas de ADN (replicación del ADN).

célula humana. Mayor importancia tiene el que el ARN posee otras muchas funciones además de la de dar lugar a las secuencias específicas de aminoácidos de las proteínas. El ARN ribosomal y el ARN de transferencia son los ejemplos más conocidos de tales ARN funcionales.

Describir la estructura y de la función los genes daría lugar a un libro entero. Todos los procesos implicados son muy complicados e involucran innumerables proteínas y otras moléculas. Afortunadamente, la mayoría de los detalles son irrelevantes para la práctica clínica. Para los clínicos, mientras que no existe límite respecto a los detalles que serían deseables para entender todos los procesos, la cantidad de esos detalles es mucho más manejable. Los temas básicos indispensables se explican más abajo, en los *Cuadros 3.2 y 3.3* y son:

- estructura general de los ácidos nucleicos como cadenas de unidades A, G, C y T (o U)
- la doble hélice
- los extremos 3′ y 5′ del ADN
- la estructura exón-intrón de los genes
- el procesamiento (*splicing*) del tránscrito primario
- el código genético

Si está interesado en saber más, existen muchos libros de texto excelentes que abordan estos temas con más detalle. Además, existen varios sitios en internet que proporcionan acceso gratuito a este tipo de material (ver *Sección 3.5*).

Estructura de los ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos (ADN y ARN) están formados por subunidades llamadas **nucleótidos**, unidas entre sí en largas cadenas. Cada nucleótido está formado por una base, un azúcar y un fosfato. Las cadenas de ADN están formadas solo por cuatro tipos de nucleótidos. El azúcar es siempre desoxirribosa y la base puede ser adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). La formulación química se da en la última sección de este capítulo. El ARN está también formado por cuatro tipos de nucleótidos. Aquí el azúcar es siempre la ribosa, y las bases son A, G, y C como en el ADN, pero en lugar de T el ARN tiene uracilo (U).

El ADN, como describieron en 1953 Crick y Watson, se encuentra en forma de dos cadenas de polinucleótidos enrolladas una sobre la otra: la doble hélice. Una característica crucial es que las dos cadenas solo pueden encajar juntas si se enfrenta cada A de una cadena con una T de la otra, y si se enfrenta cada G con cada C. El emparejamiento de las bases, A con T y G con C, explica cómo el ADN es capaz de ser replicado (*Figura 3.4*). Este mecanismo permite que la información genética de la célula madre sea copiada y transmitida durante la mitosis a ambas células hijas, como se describe en el *Capítulo 2*. El ARN no suele existir como doble hélice. Esto no es debido a ninguna característica intrínseca a la estructura química del ARN, sino a que las células normales no contienen cadenas complementarias de la mayoría de moléculas de ARN, ni ninguna enzima que pueda construir cadenas de ARN utilizando un molde de ARN. Las células utilizan el ADN y el ARN para diferentes cosas, así como sus diferencias químicas como señales de reconocimiento para enzimas diana de manera apropiada para el ADN y el ARN.

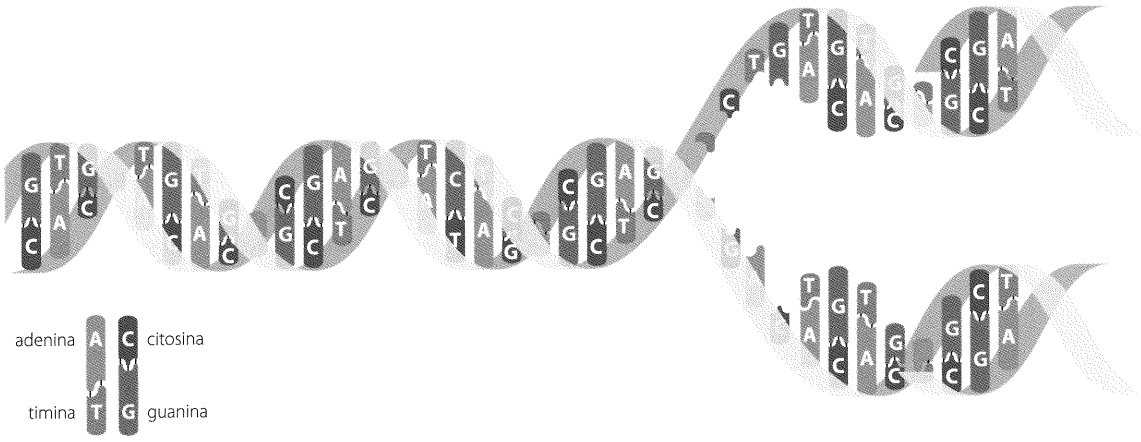


Figura 3.4 – Principio de la replicación del ADN.
Cada cadena de la doble hélice sirve como molde para la síntesis de una réplica exacta de la otra cadena. Se utiliza un mecanismo similar para realizar una copia del ARN de una cadena de la doble hélice cuando un gen es transcrito (con U en las parejas de ARN y con T en las de ADN). Este diagrama muestra el principio y el resultado de la replicación del ADN; los pasos moleculares que tienen lugar en la replicación son mucho más complicados. Este dibujo ignora el hecho de que las cadenas de ácidos nucleicos sólo pueden crecer en dirección 5′→3′ (ver *Cuadro 3.2* y *Capítulo 4*).

El genoma humano abarca alrededor de 3 x 10^9 pb de ADN (ver *Cuadro 3.1*). Una célula diploide normal contiene dos copias del genoma (dos copias del cromosoma 1, dos copias del cromosoma 2, etc.). Como se describe en el *Capítulo 2*, cada cromosoma contiene una doble hélice simple de ADN muy larga, empaquetada por histonas, y otras proteínas formando cromatina. El cromosoma 21, el más pequeño, contiene 27 Mb de ADN, el cromosoma 1, el más largo, 245 Mb. Además del genoma nuclear, la mitocondria tiene su propio genoma, compuesto por una molécula simple de ADN circular de 16569 pb de longitud.

Cuadro 3.1

Apunte sobre unidades

El tamaño de un trozo de ADN se mide en nucleótidos (nt), pares de bases (pb), kilobases (kb o kpb = 1000 pb) o megabases (Mb o Mpb = 1.000.000 pb). Debido a que virtualmente el ADN es siempre de doble cadena, la diferencia entre bases y pares de bases es a menudo ignorada cuando se habla del tamaño de un trozo de ADN. Además, el ADN de doble hélice comprendido en un millón de pares de bases puede ser descrito también como 1 Mpb o 1Mb, no son 2 Mb.

La estructura de los genes: exones e intrones

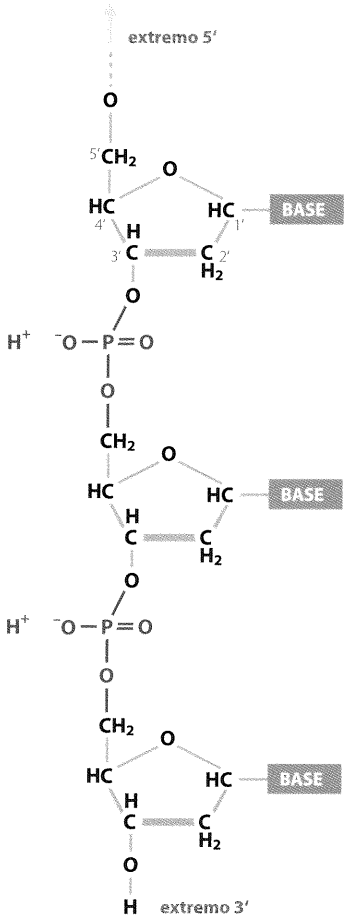
La mayoría de los genes de los humanos y de los organismos superiores están organizados de una manera extraña. La secuencia específica de ADN que dará lugar en última instancia, a la secuencia de aminoácidos de una proteína está divida en segmentos (**exones**) interrumpidos por secuencias no codificantes (**intrones**). El número y tamaño de los intrones varía. De media, los genes humanos tienen nueve exones de unos 145 pb cada uno y la media de intrones es de 3365 pb cada uno, pero el rango es muy amplio (ver *Tabla 3.1* en la *Sección 3.4*).

Cuadro 3.2

Los extremos 5′ y 3′

Para entender la genética clínica no es necesario conocer la estructura química del ADN, pero existe una característica que es importante conocer. Escribir las secuencias de ADN como una cadena de letras (como AGTTGCACG) oculta: los dos extremos no son químicamente idénticos. Observando la fórmula química del esqueleto azúcar–fosfato (ver figura abajo), las sucesivas unidades de desoxirribosa están unidas a través de átomos de carbono marcados en 5′ y 3′. La primera desoxirribosa tiene su carbón 5′ libre, mientras que la última tiene su carbón 3′ libre. Bioquímicamente esta diferencia es crucial. Las enzimas que actúan en el extremo 5′ del ADN no actúan en el extremo 3′ y viceversa. Esto da lugar a consecuencias importantes.

- Las dos cadenas de ADN de doble hélice son antiparalelas. Si la doble cadena es dibujada de manera vertical una cadena tendrá el extremo 5′ arriba, y la otra tendrá el extremo 3′ arriba. Lo mismo ocurre con las dobles hélices ADN-ARN que de manera temporal se forman cuando el gen se transcribe.



- El proceso de replicación del ADN se produce en sentido 5′→ 3′. Esto significa que todas las enzimas que unen nucleótidos (ADN polimerasas) solo pueden unir nucleótidos al extremo 3′ del polinucleótido. Esto es crucial para la reacción en cadena de la polimerasa (*Capítulo 4*). Lo mismo se puede aplicar a la ARN polimerasa cuando sintetiza ARN.

- Por conveniencia universal, se considera que las secuencias de ADN o ARN se escriben en dirección 5′→ 3′. La secuencia AGTTGCACG significa 5′-AGTTGCACG-3′. Si por alguna razón se necesita escribir una secuencia en dirección 3′ a 5′, es necesario marcar los extremos.

- Solo se transcribe una de las cadenas de ADN de un gen. A esta se la llama **cadena molde**. Supongamos que parte de esta secuencia es 5′-AGTTGCACG-3′. El tránscrito de ARN es complementario, con una A donde en el molde halla una T, G donde el molde tenga una C, etc. (ver *Figura 3.5a*). Escribiendo en la dirección normal 5′→ 3′, la secuencia será CGUGCAACU (las cadenas son antiparalelas y el ARN utiliza U en lugar de T). Incluso en secuencias muy cortas como esta, su relación no es obvia. Para evitar este problema, por conveniencia escribimos la secuencia de ADN de un gen no como una cadena molde, sino como una cadena complementaria (AGTTGCACG) que se denomina **cadena sentido**. La secuencia de ARN será exactamente igual que la cadena sentido, excepto por el cambio de T por U.

- Las secuencias situadas en el 5′ de un gen o secuencias de interés (en la cadena sentido) se les suele denominar **upstream**; aquellas que se encuentran 3′, **downstream**.

Cadena simple de ADN que muestra las terminaciones 5′ y 3′. Los átomos de carbono de los azúcares desoxirribosa están numerados como 1′, 2′, etc. La prima (′) es para distinguirlos de los átomos de carbono de las bases, que tienen su esquema de numeración (no se muestra). Los grupos fosfatos tienen una carga negativa; esta es la base para separar los ácidos nucleicos por electroforesis (*Cuadro 4.1*)

Procesamiento (*splicing*) del tránscrito primario

Cuando la célula necesita fabricar una proteína concreta primero realiza una copia en ARN de la cadena de ADN del gen específico (*Figura 3.5a*). La transcripción es un proceso muy dinámico, en el que participan pequeños segmentos dispersos por el genoma, que van variando de acuerdo con las necesidades de la célula. La secuencia de exones e intrones completa es transcrita para realizar el **tránscrito primario.** Dentro del núcleo de la célula se procesa físicamente cortando los intrones y empalmando los exones (*Figura 3.5b*). El ARN de los intrones ha sido analizado y parece que no tiene ninguna utilidad. El procesamiento (*splicing*) se realiza dentro del núcleo celular en una maquinaria multimolecular denominada espliceosoma, que es un complejo de proteínas y pequeñas moléculas de ARN. Podemos ignorar la mayor parte de los complicados detalles moleculares, pero debemos saber cómo son reconocidos los intrones.

Casi todos los intrones humanos comienzan con GU (GT en la cadena sentido del ADN se denomina sitio donador del procesamiento –*donor splice site*–) y termina en AG, sitio aceptor del procesamiento (*aceptor splice site*). Por si estas señales no son suficientes para definir sitios de procesamiento (*splice sites*), existen dinucleótidos GU y AG dentro de los exones e intrones que no se utilizan como sitios de procesamiento (sitios de corte y empalme). Para ser reconocidos como tales las GU o AG deben formar parte de una **secuencia consenso** más amplia. El sitio de procesamiento funcional tiene una combinación propia de pequeños motivos que unen proteínas o pequeñas moléculas de ARN en el pliceosoma. Estos motivos están libremente definidos, haciendo que los sitios de procesamiento sean muy difíciles de predecir analizando secuencias de ADN o ARN. Esto es frustrante

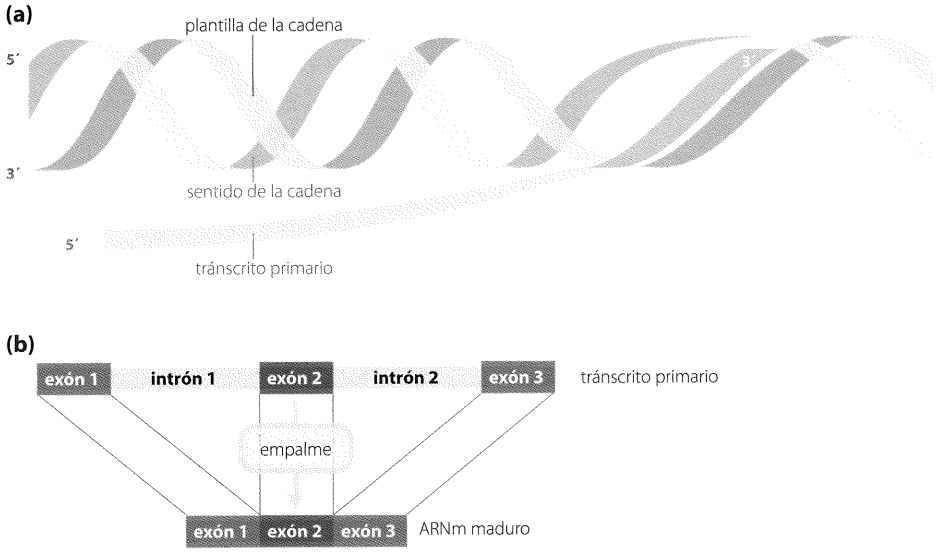


Figura 3.5 – Resumen de la transcripción.
(a) La doble hélice de ADN se desenrolla parcialmente para permitir que la ARN polimerasa realice el tránscrito primario, y vuelve a enrollarse después de que la polimerasa se haya movido a lo largo de la cadena. El tránscrito se forma utilizando la cadena molde; su secuencia es complementaria a la del molde e idéntica a la cadena sentido. (b) El tránscrito primario es procesado mediante el corte de los intrones y el empalme de los exones para formar el mensajero maduro de ARN (ARNm).

para la genética clínica porque las variaciones de secuencia que afectan a la eficiencia de los sitios de procesamiento (*splicing sites*) causan enfermedad.

Traducción y código genético

Los ARNm maduros, que ahora comprenden solo las secuencias exónicas, son transportados al citoplasma, donde se enganchan a los ribosomas. Estos son otras maquinarias multimoleculares que incluyen diferentes proteínas y varias especies de ARN no codificante. Para conocer más detalles del mecanismo de síntesis de las proteínas se pueden consultar libros o páginas web; para nuestros objetivos solo necesitamos conocer lo siguiente (ver también *Figura 3.6*).

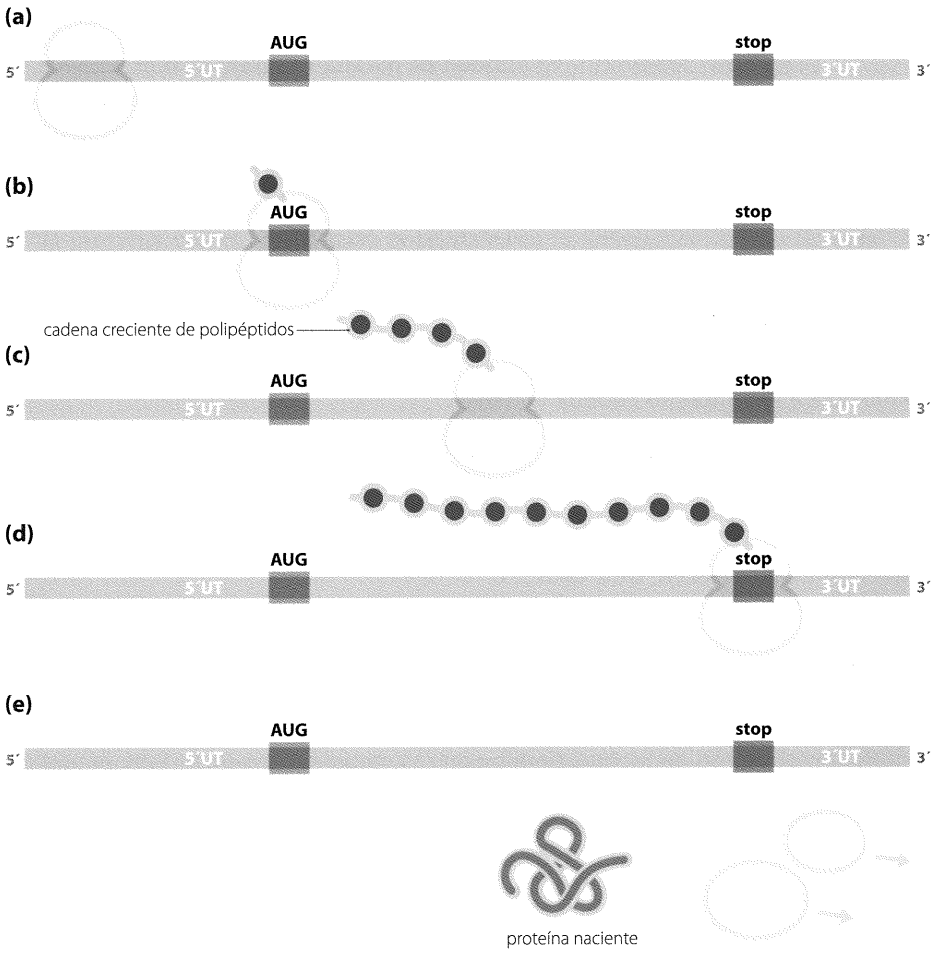


Figura 3.6 – Diagrama resumen de la traducción.
(a) Un ribosoma se une al extremo 5′ del ARNm. (b) Se mueve a lo largo de la secuencia 5′ sin traducir hasta que se encuentra con el codón de inicio AUG. En este momento atrapa el primer aminoácido. (c) El ribosoma se mueve a lo largo del ARNm, recogiendo aminoácidos de acuerdo con los codones del ARNm y los va incorporando en la cadena de polipéptidos que se va formando. (d) Cuando alcanza el codón de parada, la traducción del mensajero estará completa. (e) En ese momento el ribosoma se separa del ARNm y se disocia en sus dos subunidades y el polipéptido es liberado. La proteína funcional madura debe ser correctamente plegada, en algunos casos químicamente modificada, y transportada a su localización intra o extracelular.

- Los aminoácidos se colocan específicamente en el ARNm por tripletes de nucleótidos (codones). Ver tabla del código genético en la *Tabla 6.1.*
- La secuencia codificante comienza en algún punto por debajo del extremo 5′ del ARNm. Empieza siempre en AUG incluido en una secuencia consenso más grande (la secuencia Kozak). El trozo de ARNm entre el extremo 5′ y el codón de inicio se denomina secuencia 5′ sin traducir (5′UT).
- El codón de inicio AUG determina el patrón de lectura. El concepto de patrón de lectura está explicado mediante un ejemplo en el *Cuadro 3.3.*
- El ribosoma se desliza a lo largo del ARNm, añadiendo el aminoácido apropiado a la cadena de polipéptido creciente de acuerdo con el código genético. Los aminoácidos son transportados hasta el ribosoma por una familia de pequeñas moléculas de ARN: los ARN de transferencia (ARNt).
- El ribosoma trabaja a lo largo del ARNm hasta que se encuentra con el codón de parada o codón de *stop.* Existen tres codones de parada UAG, UAA y UGA. Cuando el ribosoma se encuentra con un codón de parada libera el polipéptido que ha hecho y se separa del ARNm. Las partes del ribosoma que quedan por debajo de la señal de parada abarcan la secuencia sin traducción 3′ (3′UT). Estas son importantes en la regulación de la estabilidad del ARNm.

Cuadro 3.3

El patrón de lectura

Considere la siguiente cadena de letras:

VERCONESALUZDELGAS

Podemos leer sucesivamente tripletes de letras en tres formas distintas:

VE RCO NES ALU ZDE LGA S ... o

VER CON ESA LUZ DEL GAS ... o

V ERC ONE SAL UZD ELG AS

De forma parecida la cadena de nucleótidos en la molécula de ARNm pueden ser traducidos por el ribosoma con tres patrones de lectura; solo uno da lugar a un mensaje con sentido. El patrón de lectura de un ARNm está definido por el codón de inicio AUG. Las mutaciones que cambian el patrón de lectura tienen efectos catastróficos en la función del gen (ver *Capítulo 6*).

La traducción no es el final de la historia

La traducción finaliza con la liberación de la recién sintetizada cadena de polipéptido del ribosoma. De cualquier manera, se necesitan varios procesos para que el polipéptido recién formado se convierta en una proteína totalmente funcional.

- El plegamiento de la cadena en una estructura tridimensional correcta no necesita información adicional; potencialmente la secuencia de amino ácidos dicta el plegamiento. De todas formas, hasta que están correctamente plagadas, las proteínas son inestables y vulnerables. También se ha llegado recientemente a la conclusión de que el plegamiento parcial o el

plegamiento incorrecto de proteínas puede ser tóxico para la célula. Un grupo de "chaperonas" ayudan en el proceso de plegamiento y protegen al polipéptido durante el mismo, mientras las proteínas con fallos en el plegamiento son detectadas y degradadas.

- Muchas proteínas incorporan modificaciones químicas al polipéptido base. Con frecuencia unen azúcares (glicosilación) o una variedad de pequeñas moléculas. La cadena puede partirse; las cisteínas deben entrecruzarse para formar puentes disulfuro S-S que anclan la estructura; otros residuos de aminoácidos se pueden modificar químicamente, por ejemplo, las prolinas pueden ser hidroxiladas. Todos los polipéptidos tienen inicialmente una metionina en el N-terminal, incorporada en respuesta al codón de inicio AUG, pero con bastante frecuencia esta se pierde.
- Las proteínas deben ser transportadas a su localización apropiada. Su destino está a menudo especificado por un péptido señal corto en el N-terminal que es eliminado durante el proceso de clasificación proteica. En otros casos la señal es una secuencia de aminoácidos situada en algún lugar dentro de la cadena y no es eliminada. En el caso de Joanne Brown (*Caso 2*), uno de sus dos genes *CFTR* posee una mutación que impide a la proteína colocarse de manera correcta en la membrana celular (la otra copia de su gen tiene una mutación diferente; esto significa que es un heterocigoto compuesto).
- Las proteínas estructurales se pueden modificar más a fondo en su localización final (*Cuadro 3.4*).

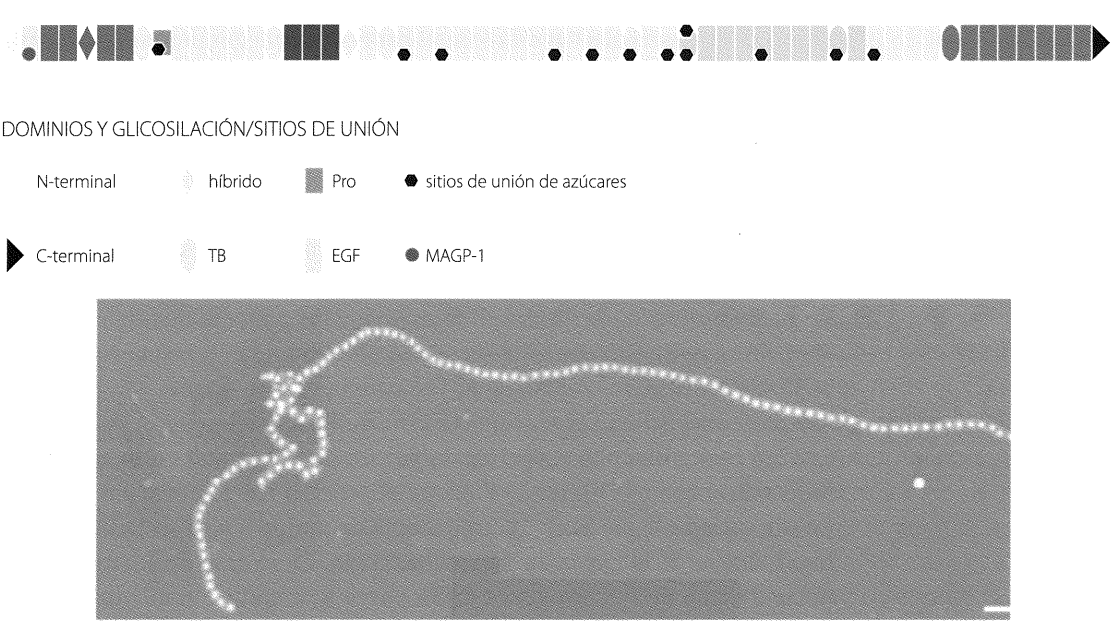
Más ejemplos de la importancia de la modificación postraduccional se describen en la *Sección 8.4*.

Cuadro 3.4

Microfibrillas: del gen a la estructura multiproteica

Las microfibrillas se encuentran en la matriz extracelular del tejido conectivo y le confieren su capacidad elástica. Su componente principal es la fibrillina, proteína defectuosa en el síndrome de Marfan **(Caso 10, familia Johnson)**. La fibrillina está codificada por el gen FBN1 en el cromosoma 15. Está compuesto por 66 exones dispuestos a lo largo de unas 235 kb de ADN genómico. El corte y empalme da lugar a un ARNm de 9749 nt. Cuando los ribosomas comienzan la traducción del ARNm los 27 primeros aminoácidos (del péptido señal) se unen al retículo endoplasmático. El polipéptido de 2781 aminoácidos es entonces inyectado en el lúmen del retículo endoplasmático a medida que es sintetizado. Aquí el péptido señal se separa, la cadena se pliega en más de 50 dominios estructurales, unidos entre sí por múltiples puentes S-S entre los residuos de cisterna (parte (a) de la figura), y se unen azúcares a 14 residuos de aspargina. La proteína es transportada como moléculas simples, o posiblemente como dímeros. Una vez fuera de la células, las moléculas de fibrillina se unen y entrecruzan de manera específica para formar las microfibrillas, grandes estructuras que aparecen bajo el microscopio electrónico como collares de cuentas (parte (b)). Cada cuenta está formada por fibrillina-1 plegada y entrecruzada, y posiblemente junto con proteínas asociadas como MAGP-1 (glicoproteína asociada a microfibrillas-1). La mayor parte de las moléculas que se asocian a la fibrillina madura son componentes menores, pero grandes cantidades de elastina están asociadas a las microfibrillas de la piel, la pared de los vasos sanguíneos, etc. Volveremos a encontrarnos con la elastina en el *Cuadro de enfermedad 3*.

Cuadro 3.4 - Continuación



(a) La larga proteína fibrillina está organizada en más de 50 dominios estructurales. (b) La microfibrilla liberada tiene una estructura en collar de cuentas bajo el microscopio electrónico. Reproducido de Kielty *et al.*, (2005) *Advances in Protein Chemistry*, **70**: 405-436 con permiso de Elsevier.

3.3. Estudio de pacientes

Muchos de los casos descritos requieren análisis del ADN. Ahora describimos cómo cada caso encaja en el dibujo de la estructura descrita en la sección anterior. Primero, trataremos dos casos en los que no hace falta estudios a nivel del ADN.

CASO 5 | Familia Elliot | 4 | 11 | 42 | **64** | 376

- Traslocación recíproca

El análisis cromosómico nos indica lo que debemos saber de esta familia. El análisis del ADN no es relevante.

CASO 10 | familia Johnson | 55 | **64** | 376

- Síndrome de Marfan

A James no se le sometió a un análisis genético cuando fue atendido por primera vez en la consulta, ya que su diagnóstico era obvio en términos clínicos. Para la mayoría de las enfermedades genéticas los análisis moleculares se han incluido en la práctica clínica en los años noventa. Durante muchos años el diagnóstico de la mayoría de las enfermedades se basaba en los antecedentes familiares, en los signos clínicos y síntomas, y en pruebas como los rayos X. Existe una gran cantidad de información disponible sobre el síndrome de Marfan porque es una enfermedad genética bastante frecuente, y las pautas formales de diagnóstico han ido aumentado (criterios de Ghent, consultar De Paepe *et al.*, 1996). No obstante,

incluso en enfermedades en las que el diagnóstico es posible solo con criterios clínicos; puede haber una necesidad de análisis molecular. Este puede utilizarse para el diagnóstico prenatal, o cuando una persona no cumple por completo los criterios de diagnóstico pero se sospecha la enfermedad.

En los siguientes casos, es necesario efectuar análisis de ADN.

CASO 1 | Familia Ashton | 1 | 7 | **65** | 104 | 150 | 376

- John, 28 años, hijo de Alfred Ashton
- ? Enfermedad de Huntington
- Otros miembros de la familia con síntomas similares
- Herencia autosómica dominante mostrada en el árbol familiar
- Petición de análisis diagnóstico

La enfermedad de Huntington está causada por un cambio en la cadena codificante de un gen del cromosoma 4, en la posición 4p16. El gen de la enfermedad de Huntington *HD* tiene 64 exones, 169 kb de ADN genómico (*Figura 3.7*) y codifica una proteína de 3141 aminoácidos denominada huntingtina. Los pacientes con enfermedad de Huntington siempre tienen un cambio en la secuencia exactamente en el mismo lugar del gen. Parte del exón 1 codifica una cadena de glutaminas en la proteína huntingtina. Cada paciente con enfermedad de Huntington tiene una expansión de esta secuencia, de manera que la proteína codificada tiene una mayor cantidad de glutaminas (véase *Cuadro de enfermedad 4*). Se necesita el análisis de ADN para comprobar el tamaño de la secuencia de poliglutaminas.

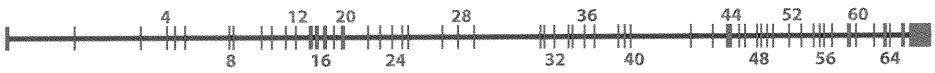


Figura 3.7 – Estructura del gen de la enfermedad de Huntington.
Las pequeñas líneas verticales representan los exones. Datos del Proyecto Genoma Humano, en GenAtlas (http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/)

CASO 2 | Familia Brown | 2 | 8 | **65** | 126 | 151 | 279 | 376

- Niña (Joanne), 6 meses de edad, padres David y Pauline
- ? Fibrosis quística
- ¿Petición de análisis molecular?

La fibrosis quística está siempre causada por mutaciones del gen *CFTR* en el cromosoma 7. Es una enfermedad recesiva, por lo que si Joanne tiene fibrosis quística, ambas copias del gen *CFTR* deben estar mutadas. El *CFTR* es un gen bastante grande, con 27 exones a lo largo de 188Kb, localizado en en la posición q31.2 del cromosoma 7 (*Figura 3.8*). A diferencia de la enfermedad de Huntington, las mutaciones pueden estar en cualquier lugar del gen. Los pacientes con fibrosis quística pueden tener mutaciones diferentes; unas 1000 mutaciones distintas han sido descritas en la *Human Gene Mutation Database*. Las dos mutaciones de Joanne pueden, a su vez, ser iguales diferentes. Todas las mutaciones son cambios en un solo nucleótido o en un pequeño número de nucleótidos adyacentes. La exploración de ambas copias del gen en busca de algún cambio representa un desafío.

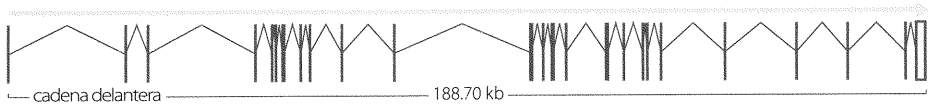


Figura 3.8 – Estructura del gen *CFTR*.
Representación de los datos del Proyecto Genoma Humano, según el navegador genómico *Ensembl*. Algunos de los exones que están muy cercanos aparecen representados como una sola línea. La flecha indica la dirección 5′→3′ de la cadena sentido.

CASO 3 | Familia Choudhary | 3 | 9 | **66** | 242 | 260 | 376

- Niña (Nasreen), 8 meses de edad, padres Aadnan y Mumtaz
- Sordera
- Sus padres son primos hermanos
- El árbol genealógico sugiere una sordera autosómica recesiva

El problema con la sordera es que, incluso cuando la causa es genética, existen mutaciones en unos 50 genes. Esto se debe a que nuestro sentido del oído utiliza un mecanismo complejo y sutil para convertir las ondas de presión del aire que alcanzan el oído en impulsos nerviosos. De manera natural el mecanismo implica a muchos componentes codificados por muchos genes diferentes. Si uno de estos falla, el mecanismo falla. No es práctico empezar con los análisis genéticos hasta conocer el gen que hay que estudiar. Esto es un problema insuperable; como se explica en el *Capítulo 9*, la aproximación más utilizada es el estudio de una mutación puntual de un gen concreto, que es la causa más frecuente de este problema. Si este análisis es negativo un laboratorio normal de análisis de ADN no será capaz de justificar el carísimo rastreo de toda la lista de posibles genes causantes. Sin embargo, la familia tan grande de Nasreen y sus tíos afectos pueden hacer posible acortar la lista de genes candidatos mediante análisis de ligamiento, el cual será estudiado en el *Capítulo 9*.

CASO 4 | Familia Davies | 4 | 10 | **66** | 102 | 151 | 181 | 279 | 376

- Niño (Martin), 24 meses de edad, padres Judith y Robert
- Retraso en los hitos motores
- Historia familiar de distrofia muscular
- El árbol genealógico muestra herencia recesiva ligada al X
- Petición de análisis diagnóstico de ADN

La distrofia muscular de Duchenne está ligada al X, por lo que el gen que la causa está en el cromosoma X. Esta en la zona proximal del brazo corto, en Xp21, y codifica una proteína, la distrofina, que es esencial para que las células musculares puedan soportar el estrés mecánico durante muchos años. El gen de la distrofina (*DMD*) es uno de los más importantes del genoma humano. Es enorme, con unos 2 millones de pares de bases de ADN (el 99,3% son intrones), y tras la formación del tránscrito primario por corte y empalme los 79 exones dan lugar a un ARNm maduro de 13 kb. Dos tercios de los casos son causados por deleciones parciales del gen. Debido a que la mayoría de la secuencia genómica son intrones, casi todos los puntos de rotura que causan las deleciones se encuentran en estos intrones, por lo que su efecto en el ARNm maduro es el de eliminar uno o varios exones contiguos (*Figura 3.9*). Buscar mutaciones en cualquier lugar de este extenso gen es un gran desafío. Por lo tanto, el análisis inicial consistirá en buscar los exones que falten, sobre todo en los más delecionados frecuentemente. Es obvio que exones delecionados se encontrarán en el ADN de niños afectos; en mujeres portadoras se encuentra enmascarado por el cromosoma X normal.

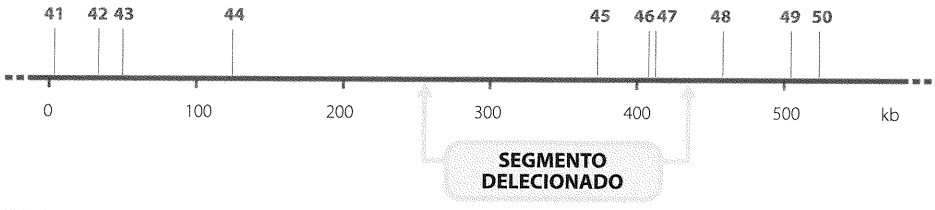


Figura 3.9 – Parte delecionada del gen de la distrofina.
Se muestra una región de 500 kb en la que se encuentran los exones 41-50. Estos son de 100-200 pb de longitud, por lo que si estuvieran dibujados a escala cada uno de ellos representaría una línea que ocuparía menos del 0,05% del total de la figura. Los puntos de rotura al azar suelen estar en los intrones. Su efecto es eliminar uno o más exones completos del ARNm maduro. La deleción muestra la eliminación de los exones 45-47 del ARNm maduro, dejando el resto de exones intacto.

- Frank, 22 años, con aumento de vista borrosa
- Historia familiar de dificultad visual
- El árbol familiar sugiere una herencia recesiva ligada al X, pero no es concluyente
- ? LHON (atrofia óptica hereditaria de Leber)
- Se pide análisis de sangre para estudiar mutación en el ADNmt

El árbol genealógico y el fenotipo clínico sugieren el diagnóstico de la atrofia óptica hereditaria de Leber (LHON). Causada por mutaciones en el ADN de la mitocondria, en lugar del ADN de los cromosomas del núcleo celular.

El pequeño genoma de la mitocondria (*Figura 3.10b*) es muy diferente al genoma nuclear. En muchos aspectos se parece más a los genomas bacterianos; una observación basada en la creencia de que la mitocondria evolucionó de bacterias que vivían simbióticamente en las células ancestrales. El genoma de las mitocondrias es compacto y circular. Tiene un tamaño de solo 16.569 bp y contiene 37 genes. Como en las bacterias, los genes están firmemente ensamblados entre sí, con muy poco ADN intergénico (contrastando con el genoma nuclear, que tiene de media unos ocho genes por megabase). Los genes mitocondriales no poseen intrones; otro punto de semejanza con los genes bacterianos. De cualquier manera, la mitocondria no es un microorganismo independiente. Muchas de sus funciones dependen de proteínas codificadas por genes nucleares que son transportadas a la mitocondria después de ser sintetizadas. Esto quiere decir que enfermedades causadas por disfunciones mitocondriales no son necesariamente originadas por mutaciones en el ADN mitocondrial. La LHON es una de las pocas enfermedades causadas por mutaciones en el ADN mitocondrial.

El ADN extraído de una muestra clínica contiene tanto ADN mitocondrial como ADN nuclear. El diagnóstico de Frank Fletcher será confirmado si en su muestra de ADN total se encuentra una mutación en el ADN mitocondrial que sea característica de la enfermedad de LHON (ver *Capítulo 5*).

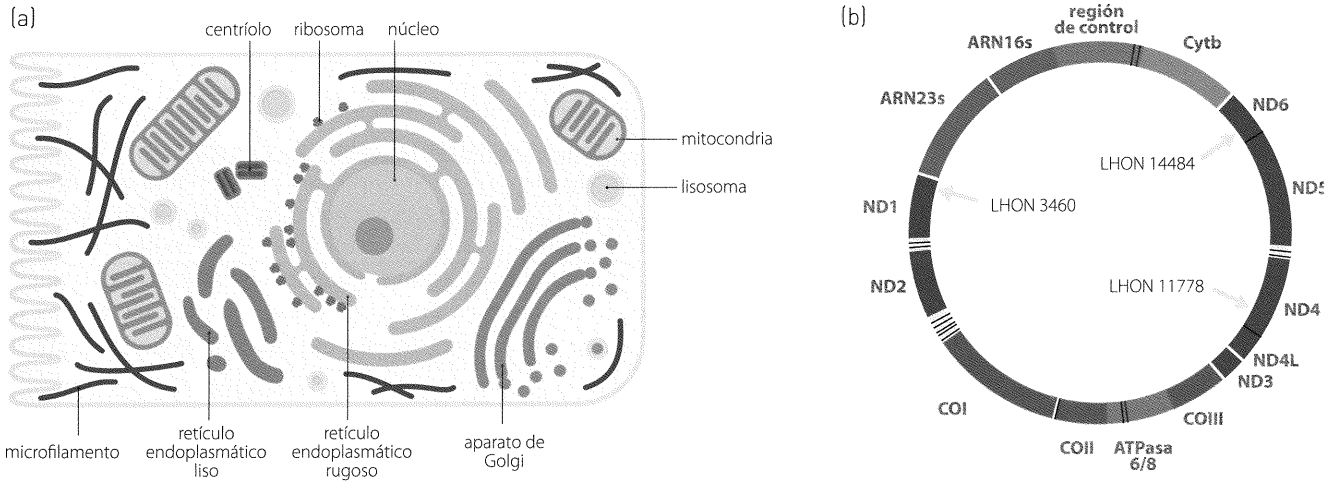


Figura 3.10 – (a) Célula mostrando el núcleo y la mitocondria. (b) Los genes codificantes de 13 proteínas están marcados y muestran las mutaciones más comunes para la LHON. Los otros 24 genes mitocondriales codifican ARN funcionales: dos ARN ribosomales (segmentos rojos) y 22 ARN de transferencia (genes marcados por finas líneas).

CASO 7 | Familia Green | 25 | 38 | **68** | 99 | 376

- Gilian (niña), edad 3 años
- Retraso madurativo
- ? Alteración cromosómica
- Petición de análisis para la microdeleción 22q11

Gilian combina la dificultad de aprendizaje con un dismorfismo leve, lo que sugiere una alteración cromosómica; sus características clínicas se asemejan a los pacientes con una deleción del cromosoma 22 en posición 22q11. Bajo el microscopio su cariotipo parece normal (*Figura 2.9*), pero una deleción de 3-5 Mb en el ADN puede no ser visible. Dado que la densidad media a lo largo de todo el genoma humano es de unos ocho genes por Mb de ADN (24.000 genes dan lugar a unas 3000 Mpb de ADN genómico), una deleción tan pequeña que no se distingue bajo el microscopio debe afectar más o menos a una docena de genes. El diagnóstico requiere, por tanto, una técnica que sea capaz de distinguir una deleción en una región del ADN que es muy pequeña en términos citogenéticos, pero demasiado grande en términos moleculares. Esto requiere una técnica diferente a las empleadas en los casos anteriores.

CASO 8 | Familia Howard | 26 | 38 | **68** | 100 | 275 | 376

- Helen, hija recién nacida de Henry y Anne (33 años)
- Síndrome de Down
- ¿Riesgo de recurrencia para futuros hijos?

Se establece el diagnóstico por las características clínicas y el análisis cromosómico (*Figuras 2.2* y *2.11*). Muchas parejas solicitan el análisis prenatal para el síndrome de Down, como en el caso de la madre de Helen, que tiene un hijo afecto, o por el riesgo aumentado debido a la edad de la mujer. Como ser explicará en el *Capítulo 14*, se tardan 2 semanas desde la obtención de las células fetales hasta que se dividen lo suficiente como para realizar análisis citogenéticos convencionales. Para evitar la estresante espera se utiliza cada vez más el análisis de ADN que facilita una prueba inmediata de células que no están en división.

CASO 9 | Familia Ingram | 26 | 41 | **68** | 102 | 182 | 376

- Isabel, primera hija de Ian e Irene.
- Talla baja en comparación con sus padres
- ? Síndrome de Turner

Se establece el diagnóstico con las características clínicas y el análisis cromosómico (*Figuras 2.3* y *2.13*). Como se explicó en el *Capítulo 2*, Isabel pudo empezar su desarrollo como un embrión 46,XY y perder el cromosoma Y en una de las divisiones mitóticas tempranas. Si cualquiera de las células de sus gónadas en cintilla mantiene el cromosoma Y, pueden dar lugar a un gonadoblastoma maligno, por lo que es importante comprobar la presencia del cromosoma Y en las secuencias de ADN. Si se encuentra en cualquiera de ellas, se recomienda una gonadectomía.

3.4. **Resumen y ampliación**

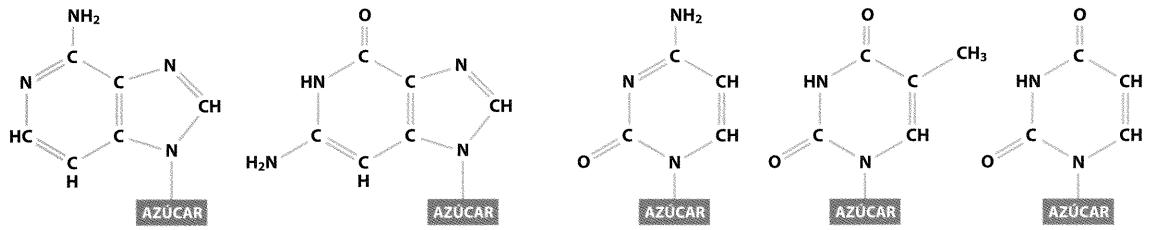
Algo de química

Por ejemplo, el *Cuadro 3.5* muestra la estructura de las bases A, G, C, T y U, y el *Cuadro 3.6* muestra los 20 aminoácidos utilizados para hacer proteínas.

Cuadro 3.5

Fórmula química de las bases A, G, C, T y U

La fórmula y los nombres muestran las bases, e indican cómo cada base está unida a un azúcar (ribosa en el ARN, desoxirribosa en el ADN). Las bases se clasifican en purinas (A, G) y pirimidinas (C, T, U). Ver *Figura 5.2* para la fórmula completa de un nucleótido.



A (adenina) G (guanina) C (citosina) T (timina) U (uracilo)

Los genes son más grandes de lo que se piensa

Un gen, definido como una unidad funcional de ADN, es más largo que la secuencia de proteína que codifica.

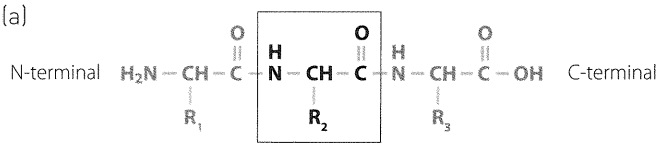
- Los genes incluyen secuencias 5′ y 3′ que no se traducen y que son importantes para la estabilidad del ARNm. Estas secuencias tienen una media de 200 y 800 nt en los genes humanos.
- El tránscrito primario deriva de la secuencia intrónica y exónica del ADN. Estos tránscritos son considerablemente más largos que el exón. En la *Tabla 3.1* hay varios ejemplos.
- Las secuencias que se encuentran por encima del sitio de inicio de la transcripción (el **promotor**) se necesitan para que se exprese el gen. Las secuencias del promotor están muy cerca del sitio de inicio de la transcripción, normalmente entre unos cien pares de bases, aunque otras secuencias más distantes afectan a menudo al promotor.
- Se sabe que la expresión de algunos genes o grupos de genes está controlada por elementos de secuencia cortos situados desde diez hasta cien kilobases de distancia. La existencia de tales elementos de control distantes entre sí es otra razón por la que los genes ocupan volúmenes de ADN más largos que su secuencia de codificación. Hoy no hay manera sistemática de identificar el **locus** de esas **regiones de control.** Se descubren por casualidad cuando una pequeña deleción o un punto de rotura cromosómico situado a cierta distancia de un gen suprime su expresión. Es interesante saber que genes cruciales que controlan el desarrollo temprano se encuentran con frecuencia situados en "desiertos génicos"; regiones de megabases de tamaño que no contienen otros genes. Es probable que tales regiones contengan elementos de control de largo alcance. El ADN que interviene se coloca hacia fuera, de forma que estos elementos descansan cerca del gen que controlan y las proteínas que se unen a ellos pueden interaccionar con las proteínas que se unen al promotor del gen.

Cuadro 3.6

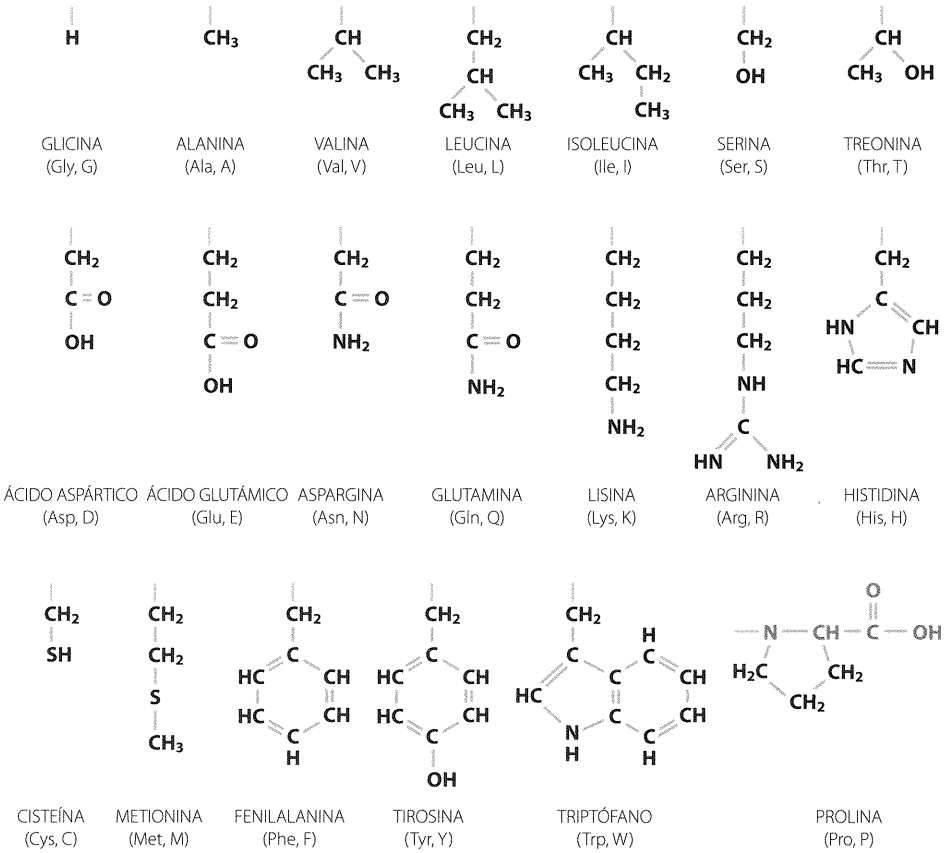
Estructura de las proteínas

(a) Fórmula química de un polipéptido. Los aminoácidos se diferencian según la naturaleza de su cadena lateral, marcadas aquí como R_1, R_2, R_3. Una proteína real probablemente contiene varios cientos de residuos de aminoácidos. (b) Fórmula química de las cadenas laterales (grupos R) de los 20 aminoácidos utilizados para hacer proteínas. Se muestran las tres letras y la letra única que se utiliza como abreviatura de los aminoácidos.

(a)



(b)



Encendido y apagado de genes. La transcripción y sus controles

Todas las células de nuestro cuerpo contienen un juego idéntico de genes; este es el propósito de la mitosis. Entonces, ¿cómo llegan a ser tan diferentes unas de

Tabla 3.1 – Estructura de algunos genes humanos

Gen	Tamaño en el genoma (kb)	N.º de exones	Tamaño medio de los exones (pb)	Tamaño medio de los intrones (pb)	Exones como % del tránscrito primario
Interferón A6 (*IFNA6*)	0.57	1	570	–	100%
Insulina (*INS*)	1,4	3	154	483	32%
HLA Clase 1 (*HLA-A*)	2,7	7	160	269	41%
Colágeno VII (*COL7A1*)	51	118	78	358	18%
Fenilalanina hidroxilasa (*PAH*)	78	13	206	6264	3,4%
CFTR (fibrosis quística)	188	27	227	7022	3,2%
Distrofina (*DMD*)	2090	79	178	26615	0,7%

El número y tamaño de los intrones varía mucho entre los diferentes genes. Se puede comprobar el tamaño de la estructura exón-intrón de cualquier gen en el catálogo genómico ENSEMBL (*Cuadro 3.7*).

otras las células del cerebro, las del hígado, las de la piel, las del músculo, etc.)? La respuesta es que expresan diferentes subconjuntos de su repertorio de genes. Además, una célula individual puede activar o desactivar genes dependiendo de sus necesidades. Una manera de hacerlo es activando y desactivando la transcripción. El control de la activación también puede ser a nivel de la traducción, pero está menos clara la importancia general a este nivel.

La exclusividad es la clave de la transcripción. Aunque un cromosoma es una única molécula de gran tamaño, los ARN producidos por transcripción son una colección de pequeñas moléculas. Solo pequeños segmentos selectivos del ADN son transcritos, y la elección apropiada de estos es crucial para la vida de la célula. Como se explica en el *Capítulo 2* (*Sección 2.4* y *Cuadro de enfermedad 2*), el ADN está empaquetado por las histonas y otras proteínas, formando la cromatina. La cromatina tiene dos configuraciones básicas: heterocromatina que está firmemente empaquetada reprimiendo la expresión génica, y eucromatina, que es más abierta y variable. Los genes de las regiones de eucromatina pueden ser o no ser expresados. La estructura local de la cromatina, determinada por complejos de remodelación de cromatina como el ATRX (*Cuadro de enfermedad 2*), proporciona un ambiente permisivo o represivo de la transcripción.

La transcripción solo comenzará cuando un complejo de iniciación multiproteico se una en un lugar apropiado del ADN. El promotor de un gen se define por una secuencia corta con motivos diferentes (normalmente 4-8 nt) a la que se unen proteínas específicas. Estas proteínas de unión al ADN se denominan **factores de transcripción.** Estas se unen a otras proteínas y forman un complejo que incluye al ARN polimerasa, que será el que realmente lleve acabo la transcripción. Cada interacción individual ADN-proteína es débil, pero una vez que diferentes factores de transcripción están anclados, las interacciones proteína-proteína forman un complejo sólido. Algunas de las proteínas del complejo de iniciación están siempre presentes en la célula, mientras otras solo se producen de vez en

cuando en la célula, o solo en respuesta a ciertas señales. Mediante diversas combinaciones, un número determinado de factores de transcripción puede alcanzar un control flexible sobre la expresión de un gran número de genes.

Una vez que comienza, el proceso de transcripción avanza hasta que alcanza la señal de parada. El resultado final (tránscrito primario) es una molécula monocatenaria de ARN, normalmente de unas 1-100 kb de tamaño, que se corresponde con la secuencia sentido del ADN (*Figura 3.5*)

Un gen a menudo codifica más de una proteína

Al contrario de lo que se explicaba en la hipótesis de un gen-una enzima, es muy común que un gen codifique diferentes proteínas (*Figura 3.11*). El mecanismo principal es el **procesamiento alternativo.** A menudo hay más de una manera para procesar el tránscrito primario. Algunos exones pueden ser incorporados o no al ARNm maduro, dando lugar a las isoformas de procesamiento. Algunas

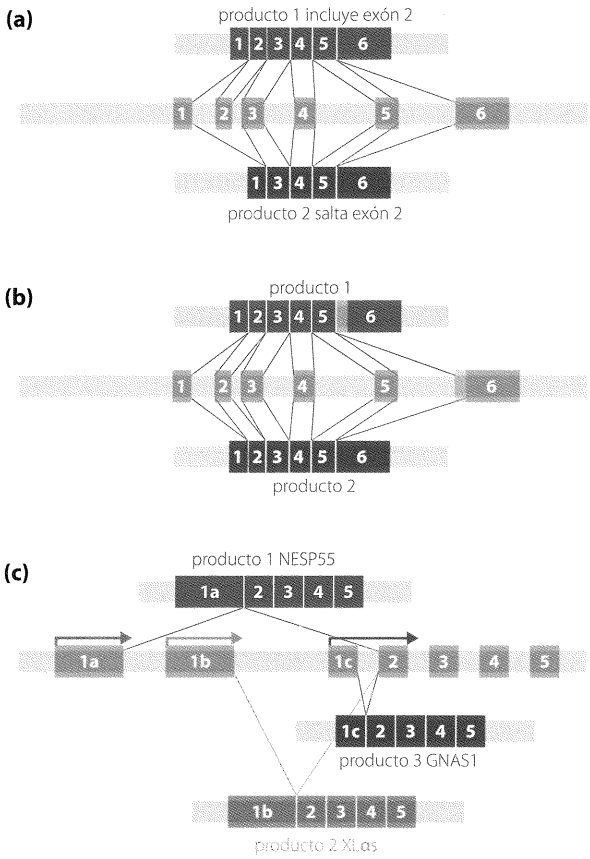


Figura 3.11 – **Cómo un gen puede codificar a más de una proteína.**
(a) Los exones pueden ser incorporados de manera variable o incluso no ser incorporados al ARNm maduro. (b) Un exón puede tener dos sitios de procesamiento alternativo. (c) Un gen puede tener dos o más promotores alternativos y primeros exones (el ejemplo muestra el gen GNAS1, que codifica tres proteínas que se denominan de manera diferente). Cualesquiera de estos mecanismos dan lugar a patrones de lectura diferentes en el gen. Más o menos la mitad de los genes humanos utilizan uno o más de estos mecanismos para dar lugar a más de una proteína.

veces existen dos sitios de procesamiento alternativo que marcan el inicio o el final de un exón. Un gen puede tener también varios promotores alternativos y primeros exones (el gen de la distrofina tiene ocho). Todas estas variables hacen que un gen pueda dar lugar a más de una proteína. La media en número de tránscritos por locus en genes estudiados en el proyecto ENCODE (ver *Capítulo 6*) está en 5.4. Probablemente parte de esta variabilidad sea solo ruido. Pero en muchos casos es funcional, dando lugar a diferentes productos con distintas funciones. Las mutaciones que afectan al equilibrio de los productos de procesamiento pueden ser clínicamente significativas, pero difíciles de reconocer.

Cuadro 3.7

El Proyecto Genoma Humano

El primer "gran proyecto de ciencia" en biología comenzó en 1990 y fue culminado triunfalmente con la publicación de la secuencia "final" del genoma humano en 2004. Las publicaciones clave (Internacional Human Genome Sequencing Consortium, 2001, 2004) por supuesto no incluyen las 3.000.000.000 As, Gs, Cs y Ts (que están en las bases de datos informatizadas), pero describen los métodos utilizados y las características clave del genoma. El artículo de 2004 es bastante breve, pero el artículo de 2001 se encuentra al nivel de *El origen de las especies* y del artículo de 1953 de Watson y Crick en el que describen la doble hélice.

La secuencia final se obtuvo uniendo literalmente millones de pequeñas secuencias de diferentes donantes anónimos, así que no representa la secuencia de ninguna persona concreta. De hecho, probablemente nadie tenga exactamente esta secuencia. Así como todos reconocemos que existen diferencias en nuestro aspecto, todos tenemos variantes en nuestro genoma. Ahora el gran interés reside en definir cómo varía la secuencia entre individuos.

La secuencia se encuentra en una base de datos gratuita y pública. Para acceder a ella se necesita un programa de catálogo genómico. Existen varios de estos programas disponibles en internet de manera gratuita. Dentro de los más ampliamente utilizados se incluyen el Santa Cruz y el ENSEMBL; por ejemplo, se puede utilizar el ENSEMBL para ver la estructura intrón-exón y la secuencia de ADN de cualquier gen cuyo nombre se conozca. Se hace así:

1. Ir a la página http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html
2. Escribir en los cuadros de búsqueda el nombre correcto del gen que queremos buscar para que el ENSEMBL pueda encontrarlo. P.ej.: *CFTR*.
3. Si el nombre es correcto, aparecerá un listado con diferentes artículos. Comprueba con cuidado cuál es el que le interesa (para el gen *CFTR*, el gen ENSEMBL es: ENSG00000001626).
4. Habiendo seleccionado el gen correcto, verás uno o más listados de transcripción; cada uno de ellos con opciones para ver *información de la transcripción, información de los exones* o *de la proteína:* la *información de los exones* te dará cómo es la estructura y secuencia de su gen. En la *Figura 1* se muestra otro ejemplo de cómo el navegador puede presentar la información (la pantalla actual muestra más información de la que se muestra en la figura, que ha sido editada para que sea más clara)

La secuencia del genoma humano es un gran logro, pero es importante comprender sus limitaciones. Es un hecho que la secuencia por sí sola no aporta demasiada información. Es necesario que se identifiquen los genes y los elementos funcionales contenidos en ella. Los navegadores como el ENSEMBL no solo contienen las secuencias, sino una gran cantidad de datos sobre ellas, por ejemplo, en identificación de genes como los que muestra la *Figura 1*. Dar sentido a las secuencias es una de las máximas ocupaciones de los científicos de todo

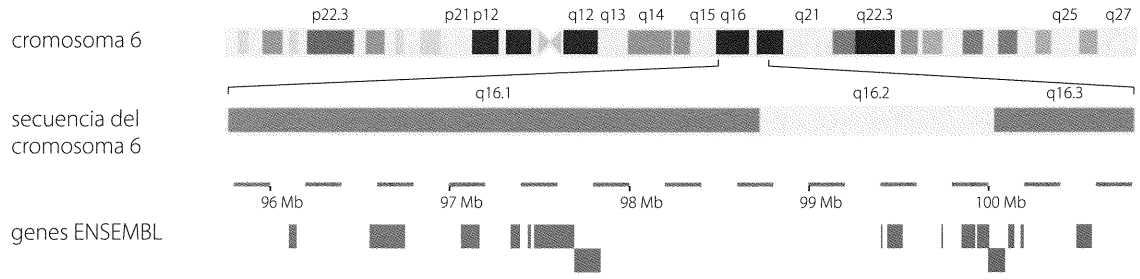


Figura 1 – Distribución de genes a lo largo de un segmento de 5 Mb del cromosma 6.
La escala es demasiado pequeña para mostrar la estructura exón-intrón de los genes; aparecen como barras de color magenta. Es un ejemplo de cómo se presenta la información del proyecto Genoma Humano en un navegador genómico; en este caso, el ENSEMBL. Normalmente aparecen más datos que pueden ser seleccionados, como las secuencias repetidas, los genes predichos por diversos programas informáticos, las homologías con otros organismos, la localización de las variantes polimórficas de la secuencia, etc. "Pinchando" sobre cualquiera de los datos, estos se abrirán dando lugar a versiones extendidas.

el mundo. Para ello utilizan una combinación de experimentos de laboratorio y análisis informáticos de las secuencias. Comparar las secuencias genómicas humanas con otros genomas secuenciados (en especial con el de chimpancé, ratón, gallina y pez globo) destaca las secuencias conservadas. Como se explica más adelante, las secuencias conservadas entre especies suelen tener funciones importantes. Aún se está lejos de conseguir un catálogo completo de genes. Los pequeños exones dispersos entre el ADN (como en el gen de la distrofina) son difíciles de identificar; los programas informáticos que analizan la secuencia tienen más problemas para identificar los genes que dan lugar al ARN funcional que los que dan lugar a proteínas. Como resultado, los 24.000 genes que se estiman son provisionales y seguramente tendrán que ser revisados en el futuro.

Incluso cuando tengamos el catálogo de genes completo, este no nos dirá por sí solo qué hace cualesquiera de sus genes. La **Genómica funcional** trata de dar esta información. Para ello, de nuevo se utilizan tanto datos de laboratorio como análisis informáticos de las secuencias de los genes. El **proteoma** humano (el conjunto completo de todas las proteínas) incluye al menos 100.000 proteínas diferentes (muchas más que el número de genes; *Figura 3.11*). Sin embargo, obtienen la mayor parte de su función mediante combinaciones de un número mucho más limitado (quizá 1000) de módulos funcionales. Así, una proteína puede tener un módulo de unión al ADN, otro de interacción proteína-proteína y un receptor para esteroides. Reconocer los módulos codificados por un gen ayuda a identificar la función de su producto proteico. Más información sobre la estructura modular de las proteínas, accediendo a la base de datos PFAM (*Figura 2*).

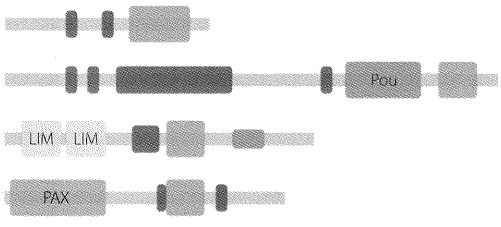


Figura 2 – Arquitectura de los dominios de las proteínas.
Datos de la base de datos PFAM (*Sección 3.5*). Es una versión simplificada obtenida de una familia proteica concreta, eligiendo el cuadro de "organización de dominios (*Domain organization*)" y seleccionando después "ver arquitecturas representativas (*View representative architectures*)". Cada línea representa una familia de proteínas y cada forma coloreada, un dominio estructural y funcional de la proteína. El homeodominio (en verde) aparece en todas las proteínas que se muestran, junto a varios dominios funcionales que se pueden encontrar formando diferentes combinaciones en otras proteínas.

Cuadro 3.7 - *Continuación*

Qué hace todo su ADN

Sorprende conocer que tenemos demasiado ADN. La visión tradicional de un genoma, basada en estudios en bacterias, es que los genes están más o menos contiguos. En las bacterias se necesita un poco de ADN entre los genes para que actúen los controles que activan o reprimen la expresión, pero la mayor parte de ADN se encuentra en los genes y cada gen comprende la mayor parte de la secuencia que codifica una proteína, con pequeñas regiones 5′ y 3′ que no se traducen y que sirven de control a los ribosomas cuando leen el ARNm. Las cosas son muy diferentes en humanos y otros organismos superiores. A diferencia de los genomas bacterianos, no más del 1,5% de nuestro ADN es codificante. Los genes están intercalados y aparentemente situados al azar en los cromosomas, con más ADN intragénico del que parece necesario para controlar la expresión génica y los mismos genes están llenos de intrones.

La comparación de los genomas del ser humano y del ratón demuestra que además de las secuencias de codificación de la proteína, el 2-3% de nuestro genoma tiene una secuencia muy similar en el ratón. Probablemente estas variantes aparecieron en diferentes lugares del genoma, pero fueron eliminadas por selección natural. Esto implicaría que las **secuencias conservadas** tengan una gran importancia funcional, relacionada muy probablemente con la regulación génica. El otro 95%-96% de nuestro genoma varía considerablemente entre hombres y ratones. ¿Para qué sirve?

Existen varias respuestas posibles (*Figura 3.12*).

- Como hemos visto, los genes están hechos de mucho más que secuencias codificantes de proteínas. Las secuencias intrónicas generalmente no están conservadas entre hombres y ratones, aunque esté la localización de los intrones. El ADN de los intrones puede incluir pequeños motivos que ayudan en el control de la transcripción o del procesamiento, pero la mayor parte de él está desprovista de función conocida.
- Algunas secuencias no relacionadas con genes tienen funciones conocidas, por ejemplo, en los centrómeros y telómeros de los cromosomas.
- Gran parte del genoma humano está hecho de pequeñas secuencias repetidas que se encuentran intercaladas a lo largo de todo el genoma. Existen 1,5 millones de copias de secuencias de 100-300 pb denominadas SINEs (*short interspersed nuclear sequences*) y 850.000 copias de secuencias denominadas LINEs (*long nuclear elements*). Estas secuencias comprenden alrededor del 13% y 21% de nuestro genoma, respectivamente. Los elementos LINE completos tienen una longitud de 6-8kb, pero la mayoría están truncados. Otras grandes familias de repeticiones ocupan más del 11% de nuestro genoma. Todos estos elementos repetitivos se cree que se han multiplicado en nuestro genoma como si de una infección se tratara. También se pueden ver como una clase de parásito genómico. Originalmente tenían la capacidad de saltar desde una localización cromosómica a otra, de ahí su nombre, **transposones**. La mayoría de ellos han perdido esta capacidad, pero algunos aún la mantienen. Si tienen alguna función útil para nosotros es una controversia, al menos parece que la mayoría son inofensivos.

- Además de estas repeticiones de alta copia, existen muchas otras de baja copia, que han surgido recientemente por procesos de duplicación. Hay muchos trazos de secuencia, incluyendo las secuencias génicas, que se duplican y posteriormente las copias divergen por acumulación de mutaciones. A menudo, cuando los genes se duplican, sólo una copia se mantiene funcional; las otras pasan a ser **pseudogenes** no funcionales. Ejemplo en el Caso 19 (*Capítulo 8*).
- Después de explicar todas estas categorías, aún queda una gran cantidad de ADN intragénico con una sola secuencia (copia única) que no está conservado entre humanos y otros mamíferos, y del que se desconoce su función.

Es motivo de discusión qué cantidad del llamado "ADN desecho" es realmente un desecho, y qué cantidad tiene alguna función aún sin descubrir. De cualquier manera, el genoma humano parece caótico. Evidentemente que no ha habido una presión selectiva para limpiar el genoma. El contraste con la perfección y eficiencia de la mayor parte de nuestra anatomía y fisiología es muy llamativo. Es fascinante especular cómo y por qué se ha desarrollado todo de esta manera.

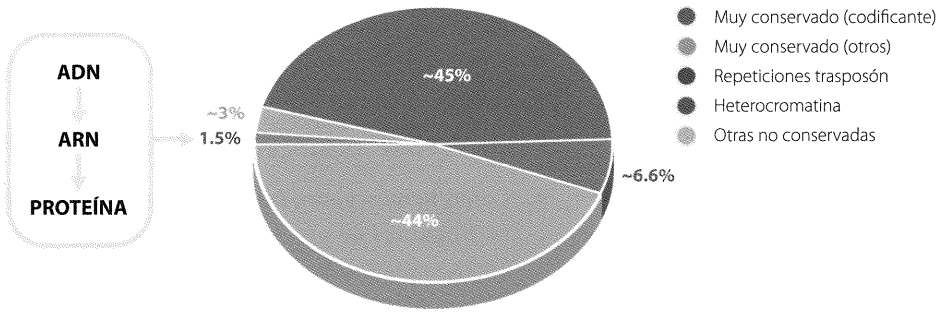


Figura 3.12 – ¿Qué hace todo nuestro ADN?
Aproximadamente el 1,5% del ADN hace lo que el Dogma Central dice que hace. Algo más del 3% se conserva entre humanos y ratones, lo que implica que tiene alguna función dependiente de secuencia. Al menos parte de la heterocromatina funciona como centrómero de los cromosomas. Alrededor de la mitad restante de ADN está compuesto de muchas copias de elementos transposónicos que se han introducido a lo largo del genoma como si de una infección se tratase. Datos procedentes de Draft Human Genome Sequence (2001).

¿Un mundo oculto de ARN?

Recientemente se han descubierto muchos ARN que no se traducen pero en algunos casos pueden ejercer mayor control sobre la expresión génica o la estructura de cromatina. Esto plantea muchas preguntas sin respuesta. Hasta el 50% de nuestro genoma se traduce, por lo menos en algunas células y en algún momento. Con los genes que se conocen se puede explicar algo de todo esto. ¿Es la mayor parte de esta actividad ruido del sistema, transcripción accidental de secuencias no funcionales porque la célula no es muy buena reconociendo genes? ¿O hay un mundo completo de especies de ARN funcional esperando a ser descubiertas? No lo sabemos.

Síndrome de Williams-Beuren (OMIM 194050)

Los niños con el síndrome de Willians-Beuren (WBS) se caracterizan por su dificultad de aprendizaje, talla baja y su facies característica con labios y mejillas prominentes y nariz corta (*Figura 1*). Muchos tienen un problema cardíaco, estenosis supravalvular aórtica (ESVA), que pueden precisar cirugía, y algunos tienen hipercalcemia infantil, lo que empeora su desarrollo y puede producir daño renal, pero que tiende a resolverse de manera espontánea. El WBS ocurre de manera esporádica; casi nunca existe historia familiar. Alrededor de 1 de cada 20.000 nacidos puede estar afectado, independientemente del sexo y del grupo étnico.

El WBS es interesante tanto por su mecanismo de origen como por su fenotipo cognitivo y de conducta. Su mecanismo de origen está relacionado con la presencia de repeticiones de baja copia. Una pista para explicar el WBS vino a través de una familia que tenía varios miembros con ESVA sin WBS. Las personas afectadas tenían una traslocación cromosómica equilibrada t(6;7)(p21.1;q11.23). El punto de rotura en el cromosoma 7 interrumpía el gen de la elastina. Como se explicaba en el *Cuadro 3.4*, la elastina, junto a la fibrillina, es el componente mayoritario de las microfibrillas elásticas que proporcionan a la piel y a las paredes arteriales su elasticidad. La ESVA es la consecuencia del déficit relativo de elastina. Era razonable pensar que los pacientes con WBS tenían deficiencia de elastina. Los investigadores examinaron una región relevante del cromosoma 7 en los pacientes de WBS y descubrieron una microdeleción. Ahora sabemos que esa deleción elimina 1,4 Mb de ADN, incluyendo al gen de elastina. Aunque la deleción es demasiado pequeña para ser vista con citogenética convencional, esta región crítica del WBS incluye al menos 24 genes.

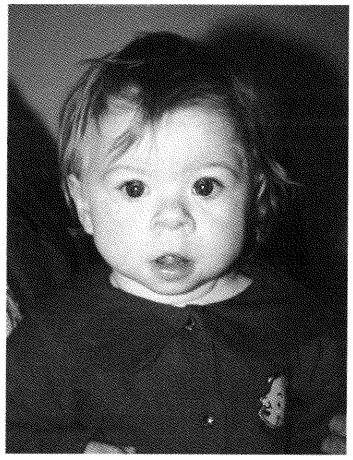


Figura 1 – **Síndrome de Williams-Beuren.**

La deleción del WBS es recurrente. La razón por la que ocurren estas deleciones patogénicas con frecuencia es porque la región delecionada se encuentra flanqueada por repeticiones de baja copia. Una región de ADN por encima de los 300-500 kb a ambos lados de la región crítica del WBS muestra más del 98% de homología. Cuando se emparejan las dos copias de cromosoma 7 durante la meiosis, en algunos casos estas repeticiones se desemparejan. Si se produce un entrecruzamiento dentro de los límites de las repeticiones desemparejadas, dará lugar a un cromosoma que portará la deleción WBS y otro con una duplicación de esta región (*Figura 2*).

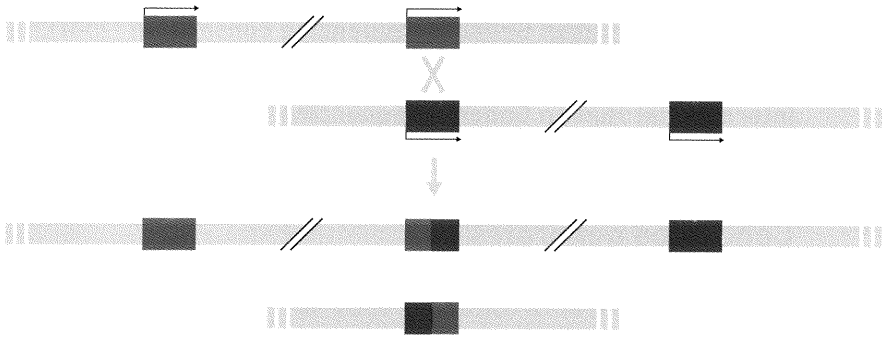


Figura 2 – **Generación de una deleción y una duplicación recíproca por recombinación entre repeticiones desemparejadas que flanquean la región crítica del WBS.**
Las repeticiones de baja copia son una característica común del genoma humano, y la recombinación entre repeticiones desemparejadas es causa frecuente de duplicaciones y deleciones de varios tamaños que causan un gran número de síndromes diferentes.

Cuadro de enfermedad 3 - *Continuación*

Aunque los niños con WBS tienen un CI global muy similar a los niños con síndrome de Down (normalmente en un rango entre 40-85), su patrón de habilidades y deficiencias es diferente. Tienen capacidades verbales relativamente buenas que contrastan con sus pobres capacidades espaciales. Si se les pide que dibujen un objeto o que copien un diagrama, un niño con WBS difícilmente reproducirá los detalles, pero fallará por completo al intentar integrarlos en el conjunto del dibujo (*Figura 3*). Por otro lado, son muy elocuentes verbalmente. También tienen comportamientos característicos y rasgos personales. Muestran ansiedad en situaciones no cotidianas pero pueden ser inapropiadamente amigables con los extraños.

El WBS nos permite ver cómo los cambios en un pequeño número de genes se relacionan con el desarrollo del lenguaje, la inteligencia y personalidad. Muchos investigadores esperan que este síndrome les permita encontrar las claves para los determinantes genéticos de la adquisición del habla, de las capacidades intelectuales y del comportamiento.

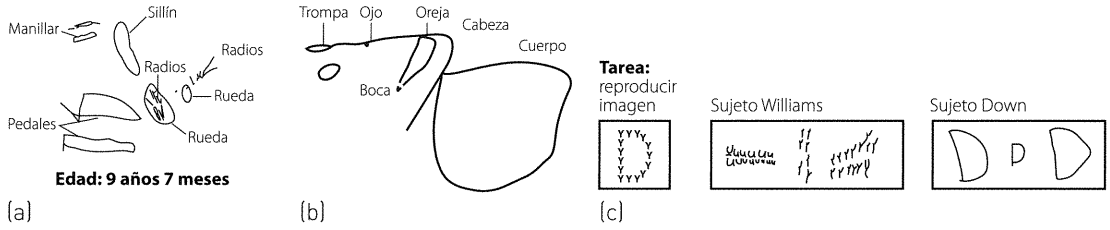


Figura 3 – Dibujos de niños con WBS.
(a) Una bicicleta y (b) un elefante. En cada caso el dibujo consiste en partes inconexas no integradas en un conjunto. (c) Se les pidió a niños con WBS y niños con síndrome de Down con la misma edad y cociente intelectual (CI) que copiaran el diagrama de la izquierda. De nuevo, se puede comprobar que los niños con WBS ven los detalles, pero no el diseño completo. Las ilustraciones se reproducen con permiso de la Dra. Ursula Bellugi, The Salk Institute for Biological Studies.

3.5. Referencias

De Paepe A *et al.* (1996) Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **62**: 417–426. *Criterio Ghent para el diagnóstico del síndrome de Marfan.*

International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**: 860–921.

International Human Genome Sequencing Consortium (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, **431**: 931–945.

Conceptos generales

NCBI Science primer – http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/

El Online Biology Book producido por MJ Farabee:
http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/BIOBK/BioBookTOC.html
Leer los *Capítulos 14–19* para ampliar los *Capítulos 3-6* de este libro.

Para encontrar más detalles sobre la estructura y función del ADN se puede leer cualquier libro de texto de genética que sea reciente, como en:

- Strachan T y Read AP (1999) *Genética molecular humana*. Ediciones Omega, S.A., Barcelona.
- Alberts B, *et al.* (2004) *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega, S.A., Barcelona.

Las primeras ediciones de ambos libros están disponibles de manera gratuita en NCBI Bookshelf – http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books

Páginas web útiles

ENSEMBL, navegador genómico: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/

Human Gene Mutation Database: http://www.hgmd.org/

PFAM, base de datos de estructuras proteicas: http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/

SANTA CRUZ, navegador genómico: http://genome.ucsc.edu

3.6. Ejercicios de autoevaluación

(1) Teniendo en cuenta la siguiente secuencia de ADN:

CCAGCTTCGCAAGTC

¿Qué base se encuentra después de un CpG dinucleótido (a) en la cadena que se muestra (b) en la cadena complementaria?

(2) Tenemos una secuencia parcial de un gen de una base de datos:

CAGCTGGAGGAACTGGAGCGTGCTTTTGAG

Escribe la secuencia de la cadena molde y del ARNm.

(3) Tenemos la secuencia de una sección de 15 nucleótidos del cromosoma 7. Está escrita en grupos de 10 para que se pueda contar de forma más sencilla. La secuencia del caso superior es el exón 1 del gen. Los nucleótidos en los extremos del caso inferior no forman parte del exón. El codón de iniciación está doblemente subrayado.

```
  1 gcagccaatg gagggtggtg ttgcgcgggg ctgggattag ggccggggcg
                                        a
 51 aaatgGGATC CTCCAAGGCG ACCATGGCCT TGCTGGGTAA GCGCTGTGAC
                  b                    c
101 GTCCCCACCA ACGGCgttag acctcagtac tgaatcagga cctcactcct
                    d                    e
```

a) ¿Qué nucleótido de la secuencia sería el primero en ser transcrito a ARNm?

b) Nombre las partes de la secuencia que están subrayadas y marcadas de a-e, eligiendo del siguiente listado:

Región 3' que no se traduce
Tercer codón

Región 5' que no se traduce
Noveno codón
Sitio aceptor del procesamiento (el final 3′ de un intrón)
Sitio donador del procesamiento (el final 5′ de un intrón)
Parte del exón 2
Parte del intrón 1
Parte del intrón 2
Parte del promotor

(4) Tenemos dos secuencias de ácidos nucleicos. La secuencia (A) es la secuencia genómica y la (B) es su correspondiente ARNm.

(A)

```
ATGACCACGCTGGCCGGCGCTGTGCCCAGGATGATGCGGCCGGGCCCGGGGCAGAACTACCCGCGTAGC
GGGTTCCCGCTGGAAGGTAAGGGAGGGCCTCAGCGCGCCGCGCTTCTCTTTTTCACCTTCCCACAGTGT
CCACTCCCCTCGGCCAGGGCCGCGTCAACCAGCTCGGCGGTGTTTTTATCAACGGCAGGTACCAGGAGA
CTGGCTCCATACGTCCTGGTGCCATCGGCGGCAGCAAGCCCAAGGTGAGCGGGCGGGCCTTGCCCTCCT
CGCCTGCCCGCCTGTTCTCTTAAAGCAGGTGACAACGCCTGACGTGGAGAAGAAAATTGAGGAATACAA
AAGAGAGAACCCGGGCGTGCCGTCAGGTACTAGGCCCATTAACCTCTCCCCGCTTCCTTCCTCCTCCCG
CCCCCAGTGAGTTCCATCAGCCGCATCCTGAGAAGTAAATTCGGGAAAGGTGAAGAGGAGGAGGCCGTC
CTGAGCGAGCGAGGTAAGCGGTGGCGCCTTGGGCGGCGGTTGAAGTAGCTTTTATGCCCTCAGGAAAGG
CCCTGGTCTCCGGAGTTTCCTCGCATTAAAGGAGAGAGAGAGAGAGTACTCTTTTGACTGGT
```

(B)

```
AUGACCACGCUGGCCGGCGCUGUGCCCAGGAUGAUGCGGCCGGGCCCGGGGCAGAACUACCCGCGUAGC
GGGUUCCCGCUGGAAGUGUCCACUCCCCUCGGCCAGGGCCGCGUCAACCAGCUCGGCGGUGUUUUUAUC
AACGGCAGGUACCAGGAGACUGGCUCCAUACGUCCUGGUGCCAUCGGCGGCAGCAAGCCCAAGCAGGUG
ACAACGCCUGACGUGGAGAAGAAAAUUGAGGAAUACAAAAGAGAGAACCCGGGCGUGCCGUCAGUGAGU
UCCAUCAGCCGCAUCCUGAGAAGUAAAUUCGGGAAAGGUGAAGAGGAGGAGGCCGUCCUGAGCGAGCGA
GGAAAGGCCCUGGUCUCCGGAGUUUCCUCGCAUUAAAGGAGAGAGAGAGAGAGUACUCUUUUGACUGGU
```

¿Cuántos exones tiene este gen? Haga una pequeña tabla mostrando el número de nucleótido (en la secuencia genómica) desde el inicio al final del cada exón, y el tamaño de cada exón e intrón. En los genes reales el tamaño de intrones sería mucho mayor que en este ejemplo.

(5) Busque los siguientes genes con ayuda de navegadores genómicos como Ensembl o Santa Cruz: *BRCA1, GJB2, DYS.*

(a) ¿Cuántos tránscritos tiene cada uno?

(b) Elija un tránscrito de cada gen, escriba su número ID y cuente cuántos exones tiene.

(c) ¿Qué relación hay entre los diferentes tránscritos?

(d) ¿Qué tamaño tiene el gen, desde el final del 5′ del exón 1 hasta el final del 3′ del último exón? Tenga en cuenta que los nucleótidos se cuentan desde el extremo del brazo corto del cromosoma. Debido a que las dos cadenas de la doble hélice son antiparalelas, los genes de una cadena se transcriben desde el extremo del brazo corto hasta el extremo del brazo largo, mientras que aquellos que se encuentran en la otra cadena se transcriben en la dirección opuesta. Por lo tanto, los genes de una cadena se enumeran siguiendo la dirección 5′→3′ a lo largo de la cadena sentido; para aquellos que se encuentran en la otra cadena la numeración va en el otro sentido.

Capítulo **4**

¿Cómo se puede estudiar el ADN de los pacientes?

Conceptos y habilidades que aprenderá en este capítulo

Después de leer este capítulo será capaz de:

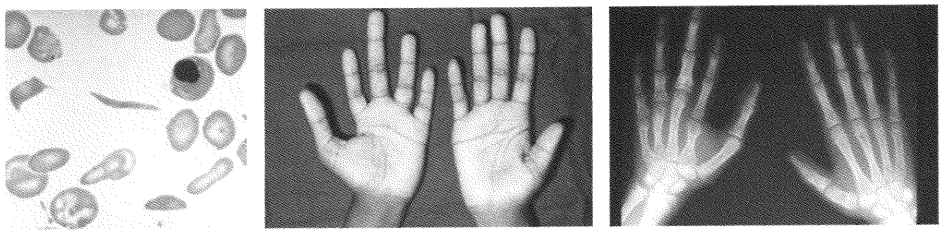
- Enumerar las principales aplicaciones de la hibridación de los ácidos nucleicos.
- Describir qué es un microarray y cómo se puede utilizar.
- Dibujar un diagrama que muestre los principios de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Conocer las aplicaciones de la PCR, *Southern blotting*, *Northern blotting*, FISH y arrays de CGH.
- Saber qué información se puede y no se puede predecir mediante el análisis de ADN con estas técnicas, y qué información adicional se puede obtener con el estudio del ARN o de las proteínas.

4.1. Historias clínicas

CASO 11 | Familia Kavanagh | **81** | 97 | 152

- Primer hijo sano
- Segundo hijo, Celia, pálida con niveles de hemoglobina bajos
- Anemia falciforme

Ken y Carol son una pareja sana cuyo primer hijo, Keith, nació cuando vivían en su país natal, Kenia. Ken prosperó y poco tiempo después, Carol se quedó embarazada de nuevo. Esto coincidió con el traslado de la familia a Inglaterra para que Ken pudiera realizar estudios de postgrado y, poco después de su llegada, nació Celia. A los tres meses de edad comenzó con hinchazón dolorosa en los dedos y fue remitida a su pediatra, quien se dio cuenta de que estaba muy pálida y tenía un agrandamiento del bazo. Sus niveles de hemoglobina eran bajos, solo de 7 g/dl, y su recuento de reticulocitos era solo del 12%, lo que indicaba una anemia hemolítica. El diagnóstico de la anemia falciforme se realizó examinando una preparación de su sangre que mostraba eritrocitos en forma de hoz. Carol se había formado como enfermera en Kenia y conocía bien la anemia falciforme. Sabía que probablemente iba a tener crisis acompañadas de graves dolores óseos y abdominales que obligarían a su ingreso hospitalario y que necesitaría transfusiones, así como penicilina de por vida. Los siguientes meses fueron muy duros para la familia, tratando de adaptarse a un país nuevo y a las noticias sobre el estado de Celia. Carol quedó otra vez embarazada, Ken y Carol estaban muy preocupados; siempre habían deseado tener tres hijos, pero eran conscientes del riesgo de que el nuevo bebé tuviera la anemia falciforme. Pensaron que la única opción era el aborto. Sin embargo, cuando visitaron al ginecólogo este les explicó que existía la posibilidad de hacer un análisis en los primeros meses de embarazo para saber si el bebé estaba afectado o no. Conocieron así que el riesgo de tener un hijo afecto era de 1 a 4 y de tener un hijo sano o portador de 3 a 4, por lo que comenzaron a sentirse mucho mejor.



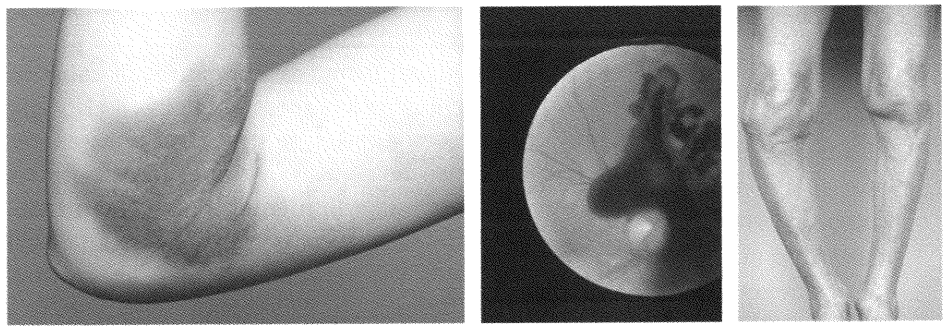
(a) (b) (c)

Figura 4.1 – Anemia falciforme.
(a) Preparación de células sanguíneas que muestra las células falciformes, marcada poiquilocitosis (glóbulos rojos con forma anormal) y glóbulos rojos nucleados. (b y c) Infartos óseos en falanges y metacarpo que dan lugar a dedos de distinta longitud. Fotos cortesía del Dr. Andrew Hill, Royal Manchester Children's Hospital.

CASO 12 | Familia Lawton | 82 | 98 | 376

- Historia familiar de hemofilia
- Lactante varón, Lennox, con cefalohematoma

Lennox fue el primer hijo que tuvieron Lillian y Leslie Lawton. Lillian sabía que sus tíos tenían hemofilia, pero hasta que estuvo embarazada, su madre no le contó más sobre la historia familiar y las posibles implicaciones sobre el bebé que Lillian esperaba. Tenía una hermana sana, pero su madre tenía tres hermanos varones, dos de los cuales habían sido diagnosticados de hemofilia durante la infancia. Los tíos afectos de Lillian tenían problemas de movilidad junto con sangrados repetidos en codos y rodillas tras actividad o pequeños golpes, pero ambos eran capaces de manejarse por sí mismos y acudir a su centro local de hemofílicos cuando tenían problemas o para su seguimiento. Uno de ellos, que solía utilizar una motocicleta, terminó en cuidados intensivos tras resbalar con ella en una calle helada, precisando muchos meses de cuidados y rehabilitación. Lillian sabía que la hemofilia solo se daba en niños. Durante su embarazo pidió consulta con un genetista clínico y este le explicó que el riesgo de tener un niño afecto era de 1 a 16 (su riesgo de ser portadora era 1 a 4, el riesgo de su embarazo si era portadora era de 1 a 4: ¼ x ¼ = 1/16). Lillian decidió esperar a que el bebé naciera.



(a) (b) (c)

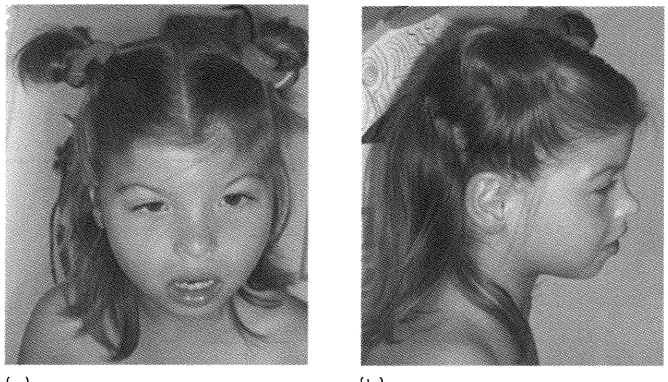
Figura 4.2 – Efectos de la hemofilia.
(a) Hematoma alrededor del codo. (b) Sangrado retiniano. (c) Los continuos sangrados en las articulaciones producen artritis severa. Fotos (a) y (c) cortesía del Medical Illustration Department, Manchester Royal Infirmary, y (b) Dr. Andrew Hill, Royal Manchester Children's Hospital.

El parto fue lento y Lillian necesitó forceps durante el alumbramiento. Parecía que Lennox estaba bien, pero tenía una gran hinchazón en un lado del cráneo; la matrona les comentó que se trataba de un cefalohematoma que iría desapareciendo gradualmente. Pero cuando el pediatra conoció la historia familiar pensó que el cefalohematoma podía indicar que el bebé estaba afecto y sugirió que se realizaran los análisis lo antes posible. Así, ante cualquier síntoma de sangrado de las articulaciones se minimizarían los problemas.

CASO 13 | Familia Murphy | **83** | 100 | 376

- Niña, Michelle, con características dismórficas
- ? Anomalía cromosómica desequilibrada

Michelle era la tercera hija de Max y Millie. Sus dos hijos varones estaban sanos y se desarrollaban de manera correcta. La pareja estuvo encantada cuando su hija nació después de un embarazo de riesgo. Las ecografías mostraban hinchazón en la zona posterior del cuello a las 18 semanas de gestación y las ecografías posteriores, hinchazón en la pelvis de uno de los riñones. Sin embargo, la pareja se tranquilizó cuando, tras una amniocentesis, el bebé mostró un patrón cromosómico normal. Más tarde, el pediatra descubrió un soplo cardíaco y comenzó así el primero de los muchos análisis. Durante los siguientes meses el desarrollo de Michelle fue otra causa de preocupación; necesitaba una sonda para ser alimentada y tardó mucho en aprender a sentarse y a sonreír. El pediatra la envió al genetista clínico para que realizara el diagnóstico. Los genetistas clínicos tienen un interés especial por la dismorfología (estudio de los patrones de defecto en el nacimiento, que se describen en el *Cuadro 4.1*). Además de los problemas cardíacos y de riñón, y de una microcefalia que había llegado a ser evidente, Michelle tenía también un número significativo de características dismórficas. Entre ellas se incluían epicanto, ojos muy separados, *philtrum* corto e implantación baja de las orejas. También tenía el quinto dedo de ambas manos incurvado y las falanges distales acortadas.



(a) (b)

Figura 4.3 – Niña con múltiples anormalidades congénitas que sugieren una anormalidad cromosómica.
Tiene retraso mental grave, retraso del crecimiento, microcefalia y dismorfismo de cara y manos (epicanto, hipertelorismo, cejas arqueadas, implantación baja de orejas, *philtrum* corto, boca abierta permanente, labios gruesos, malimplantación de los dientes inferiores, clinodactilia del 5º dedo y braquidactilia distal). Cortesía del Dr. Bert Vries, Nijmegen.

Michelle tenía dificultades de aprendizaje junto con características dismórficas, lo que sugería una anomalía cromosómica desequilibrada. Como en el caso de Gillian Green (Caso 7; deleción ?22q11), su cariotipo era a grandes rasgos normal, pero su fenotipo no daba ninguna pista sobre qué cromosoma portaba el cambio submicroscópico y necesitaba un análisis que estudia la totalidad del genoma en busca de cambios en número de copia (duplicaciones o deleciones).

Cuadro 4.1

Malformaciones, deformaciones, displasias, síndromes

Malformación: anomalía morfológica que aparece debido a un proceso de desarrollo anormal. Error primario en la morfogénesis. P.ej.: labio leporino.

Secuencia malformativa: patrón de múltiples defectos como resultado de una única malformación primaria. P.ej.: El pie zambo y la hidrocefalia como resultado de un defecto del tubo neural.

Síndrome malformativo: patrón de malformaciones, normalmente con una causa subyacente común, que aparecen como consecuencia de varios errores en la morfogénesis (la palabra "síndrome" deriva del griego 'corriendo juntos'.

Deformación: distorsión de una estructura normal debida a una fuerza física.

Disrupción: destrucción de un tejido que previamente era normal.

Displasia: organización celular anormal en un tejido que tiene como resultado cambios estructurales. P.ej.: displasias esqueléticas (cartílago y hueso).

4.2. Antecedentes

Una célula humana diploide contiene 6 x 10^9 pb de ADN, todas son químicamente idénticas y están compuestas por nucleótidos A, G, C y T. Para que la mayoría de nuestros casos puedan estudiarse, requeriremos examinar regiones de cromosomas o genes en muestras de ADN de los pacientes. ¿Cómo podemos llegar a esta especificidad teniendo tanto ADN químicamente idéntico?

La mayoría de los métodos se basan en una o dos aproximaciones esenciales:

a) Hibridar la secuencia del paciente con otra específica marcada (**sonda**).
b) Amplificar la secuencia que nos interese; para generar una gran cantidad solo de la secuencia que nos interesa.

Los principios y las aplicaciones que van a ser utilizadas en las investigaciones de este capítulo serán descritas a continuación. Otras que son importantes en genética clínica serán descritas en la sección final del capítulo.

Hibridación de ácidos nucleicos

Los pares de bases de las dos cadenas de la molécula de doble hélice de ADN están unidos entre sí por uniones químicas relativamente débiles (puentes de hidrógeno). Estas uniones se pueden romper llevando a ebullición una solución que contenga el ADN, o exponiéndolo a pH elevados. Este proceso es reversible y se denomina **desnaturalizar** el ADN. Las cadenas complementarias de ácidos nucleicos **hibridarán** (unión de dos cadenas para formar una doble hélice) si se

mezclan en una solución a una temperatura (por debajo de los 50°-60 °C) y pH moderados (Figura 4.4). Esta capacidad de unión específica entre las cadenas hibridándose entre sí es la base de gran parte de la tecnología del ADN.

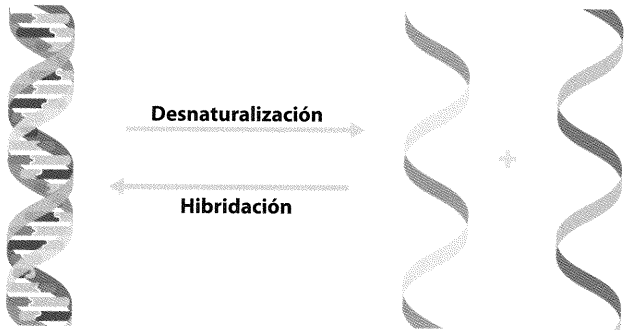


Figura 4.4 – Desnaturalización de la doble cadena de ADN. Hibridación de dos cadenas complementarias de ADN.

La hibridación no necesita que las dos cadenas encajen perfectamente entre sí. Las dos cadenas hibridarán si existen suficientes pares de bases correctos para que se formen los puentes de hidrógeno. Las cadenas que contengan pares de bases mal emparejados tendrán una temperatura de desnaturalización inferior a aquellas que estén perfectamente emparejadas, y necesitarán igualmente una temperatura inferior para que hibriden con éxito. Las cadenas cortas se desnaturalizan con más facilidad que las cadenas largas porque hay menos puentes de hidrógeno. Necesitan una temperatura de hibridación menor para la hibridación, y esta será más sensible a las uniones inespecíficas. Manipulando estas variables, la hibridación se puede usar de diferentes formas para el análisis de ADN.

Utilización de la hibridación como base en el análisis de ADN

Los análisis de hibridación utilizados en genética clínica son de dos tipos:

- Algunas veces el análisis se utiliza para comprobar una mutación puntual o un cambio muy pequeño en una muestra de ADN. En el caso de la familia Kavanagh (Caso 11; anemia falciforme), si tenemos que comprobar en su feto la mutación de la anemia falciforme mediante un análisis de ADN, necesitaremos buscar una sustitución de un nucleótido específico en los 3.000.000.000 de su genoma. Una manera de hacerlo es utilizar un pequeño **oligonucleótido** sintético como sonda de hibridación. Con una sonda tan pequeña, las condiciones de hibridación deben ser las ideales. Incluso que no encaje un simple nucleótido puede ser suficiente para que no se produzca la hibridación. La hibridación altamente específica es también un prerrequisito para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, véase la explicación más adelante). Aunque la PCR no es un análisis de hibridación, su capacidad de amplificar una secuencia específica concreta depende de la hibridación específica.
- Otras veces queremos que la hibridación funcione en todo el ADN, descubriendo pequeñas diferencias entre los ADN de diferentes personas. En el caso de Gillian Green utilizamos la hibridación para comprobar microdeleciones cromosómicas (Caso 7; ?deleción 22q11) o en el de Michelle Murphy (Caso 10; ¿microdeleción?), no queremos que la

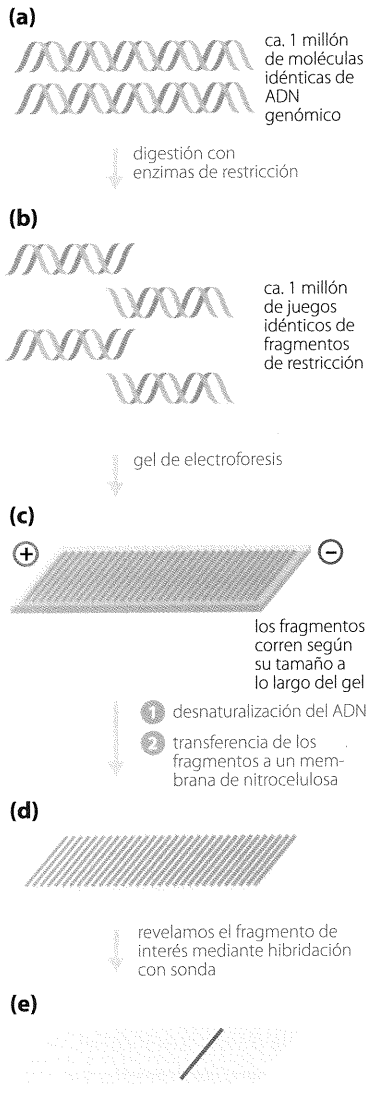


Figura 4.5 – Análisis de ADN por *Southern blot*.
El ADN problema (a) se digiere con endonucleasas de restricción (b). Los fragmentos se separan por tamaño en un gel de eletroforesis (c), desnaturalizados sumergiendo el gel en álcali; transferidos a una membrana de nitrocelulosa (d). Esta se sumerge en una solución con la sonda marcada, revelando cualquier fragmento que hibride. Para detalles ver *Cuadro 4.2*.

hibridación falle porque la secuencia correspondiente del paciente tenga una pequeña variación de nucleótidos. La falta de hibridación demostrará que toda la secuencia está delecionada. Para este tipo de análisis utilizaremos sondas de hibridación más largas, normalmente clonadas a partir de ADN natural. Una sonda de 1 kb hibridará con su secuencia complementaria aunque existan pequeñas variaciones entre individuos.

En cualquier protocolo en el que se utilice la hibridación, necesitaremos saber si nuestra sonda ha sido capaz o no de hibridar con el ADN problema. Para solucionarlo, lo más normal es marcar la sonda. Antiguamente el ADN se solía marcar incorporándole P^{32} radioactivo; hoy día la forma más común de marcaje es con fluoróforos. Normalmente la separación se realiza fijando la prueba a un soporte sólido; por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa o un portaobjetos. Estos se sumergen en una solución que contenga la sonda marcada, se deja que hibriden, luego se saca de la solución y se lava. El marcaje señalará las áreas del soporte sólido donde se haya producido hibridación. Los problemas que se plantean en este capítulo serán solucionados así:

- ***Dot blotting:*** Familia Kavanagh (Caso 11, anemia falciforme). El ADN fetal se coloca formando pequeños puntos en una membrana de nitrocelulosa sumergida en una solución que contiene sondas de oligonucleótidos de secuencias normales y secuencias de anemia falciforme marcados diferencialmente. Ver *Figura 4.11*.
- ***Southern blotting:*** Familia Lawton (Caso 12, hemofilia). La pregunta es si su hijo afecto tiene o no una inversión grande del cromosoma X que interrumpa el gen F8. El protocolo está resumido en el *Cuadro 4.2* y la *Figura 4.5*. El *southern blotting* se puede utilizar para comprobar la presencia o ausencia de una secuencia problema, o para comprobar el tamaño de los fragmentos de restricción donde está localizado. En los años ochenta era la técnica más utilizada en los laboratorios de genética clínica, pero ha sido prácticamente sustituida por la PCR. El *southern blotting* todavía se utiliza para analizar fragmentos mayores a varias kb. Se necesita en estos casos porque la posición de inversión de los puntos de rotura no pueden ser especificados por adelantado. La PCR se complica a medida que el tamaño de la diana a estudiar aumenta.
- **Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)** se utiliza para comprobar la presencia o ausencia, número de copias y localización normal de una secuencia de ADN en los cromosomas de un paciente. En el caso de Gillian Green (Caso 7; ?deleción 22q11) queremos comprobar una deleción del tamaño de varias megabases en una localización cromosómica específica. Si está presente la deleción, esta afectará solo a uno de los dos cromosomas homólogos. Para obtener información sobre la localización cromosómica, la hibridación tendrá lugar en un portaobjetos con una extensión de cromosomas de la paciente, en lugar de ADN libre. Mediante un protocolo muy cuidadoso se desnaturaliza el ADN de los cromosomas de la extensión sin modificar su estructura. Aunque cada secuencia tenga a su pareja cerca, porque están fijadas en el portaobjetos, las parejas no pueden moverse para encontrarse unas con otras, por lo que el ADN cromosómico suele ser de cadena sencilla. El portaobjetos es

Cuadro 4.2

Principios del *southern blotting*

Primero se corta el ADN problema en fragmentos específicos gracias a una enzima especial (endonucleasa de restricción. Ver *Cuadro 4.3* y *Figura 4.5b*). Estas enzimas cortan el ADN de una manera reproducible, de forma que cada molécula da lugar al mismo juego de fragmentos. La mezcla de fragmentos se corre en un gel de electroforesis (*Cuadro 4.4*), con lo que los fragmentos de diferentes tamaños ocuparán diferentes posiciones (*Figura 4.5c*). Los fragmentos, que mantienen su patrón dependiente de tamaño, se desnaturalizan en álcali para convertirlos en cadena sencilla. Queremos saber qué fragmentos hibridarán con nuestra sonda, pero la hibridación no funciona de manera eficiente en muestras de ADN inmovilizadas en gel. Las moléculas no se pueden mover libremente para encontrar su complementaria. Por lo tanto, el siguiente paso es transferir los fragmentos a una membrana de nitrocelulosa manteniendo su patrón de bandas. Este es el protocolo actual del *southern blotting*. Lo normal es dejar la membrana de nitrocelulosa sobre el gel, poner unas láminas de papel seco a ambos lados y presionar con cuidado de tal manera que el líquido que está en el gel pasa a través de la membrana de nitrocelulosa y se queda en las láminas de papel. El ADN desnaturalizado se pega a la membrana de nitrocelulosa (*Figura 4.5d*). De nuevo, se sumerge la membrana en una solución que contiene la sonda marcada que se unirá en el fragmento de interés y revelerá su posición (*Figura 4.5e*). La localización de la sonda se detecta por autorradiografía o por fluorescencia. Esta técnica nos permite saber si la secuencia de interés está presente y en qué fragmento de restricción se encuentra.

expuesto a una solución que contiene la sonda marcada. Un trozo clonado de ADN, de unas diez kilobases, será el que se utilice como sonda y, como ya se mencionó con anterioridad, las pequeñas variaciones en la secuencia no afectarán a la hibridación. La sonda está marcada con un fluoróforo. Tras la hibridación se lava el portaobjetos y se examina al microscopio. Donde haya hibridado la sonda aparecerán un par de puntos fluorescentes en un cromosoma concreto (un par de cromosomas porque en esta etapa del ciclo celular cada cromosoma tiene dos cromátidas hijas, ver *Capítulo 2*). La *Figura 4.6* muestra el principio y la *Figura 4.14* un ejemplo actual.

- **FISH en interfase:** A Helen Howard (Caso 8, síndrome de Down) se le ofreció un análisis prenatal para saber si su feto tenía síndrome de Down. Las células fetales se obtuvieron por amniocentesis (ver *Capítulo 14*). El FISH de interfase permite contar cromosomas específicos sin tener que esperar a que las células en cultivo se dividan. Como en el protocolo estándar de FISH, las células se inmovilizan en un portaobjetos, se desnaturaliza con cuidado el ADN y se aplica una sonda fluorescente. La sonda es una secuencia específica del cromosoma. Se cuenta el número de puntos fluorescentes por núcleo; los puntos se cuentan en varias decenas de células para obtener un resultado que se ajuste a la realidad.
- **La hibridación genómica comparativa (CGH)** es un método general para comprobar variaciones en el número de copia. Esto es, comprobar que una secuencia está presente en mayor o menor número de copias en un genoma concreto comparándolo con un ADN control. Puede detectar variaciones que son demasiado pequeñas para ser vistas bajo el microscopio y, a diferencia del FISH, no requiere saber de la localización de la variación.

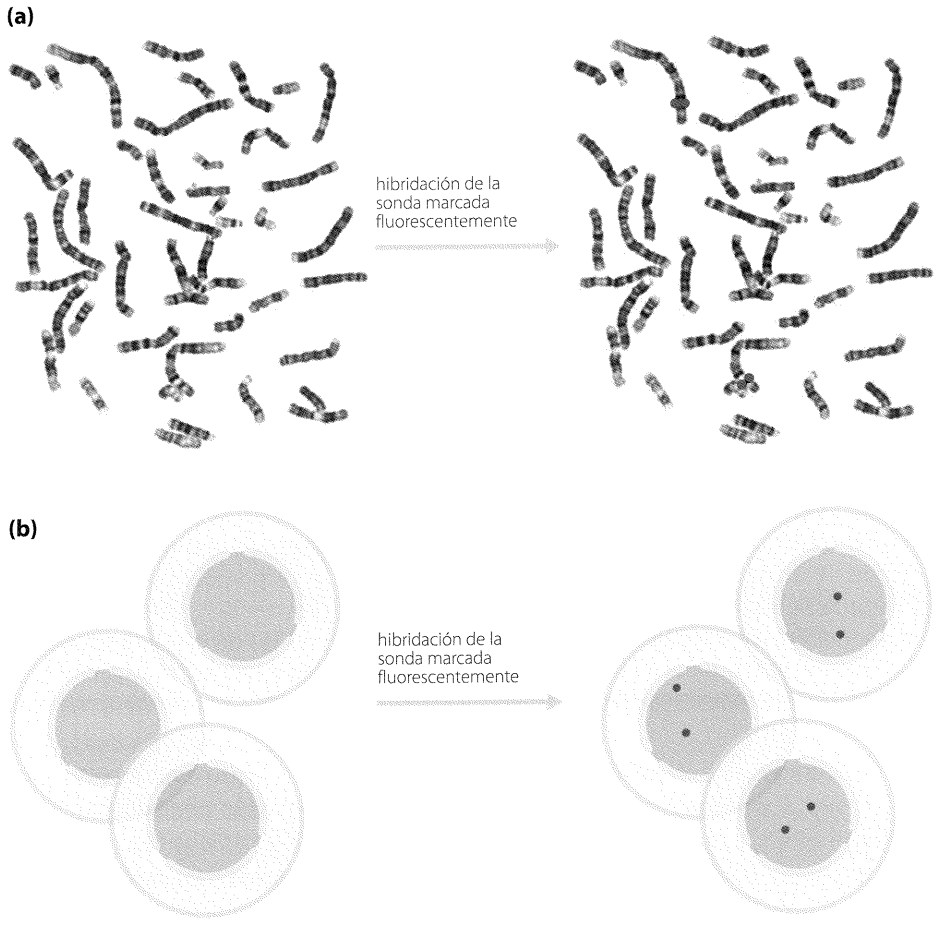


Figura 4.6 – Hibridación *in situ* fluorescente (FISH).
El FISH se puede usar tanto en preparaciones cromosómicas (a) como en células que no están en división (b). En cualesquiera de los casos el material, en un portaobjetos, se desnaturaliza con cuidado y luego se hibrida con una sonda fluorescente. Para ejemplos ver *Figuras 4.14* y *4.15*.

Se utilizó en el Caso 13 (Michelle Murphy, dismórfica con retraso mental) para ver si tenía deleciones submicroscópicas o duplicaciones.

Las muestras están en forma de **microarray**. Los microarrays usan el mismo principio que el **dot blot**, pero a escala masiva. En este caso es la sonda la que está fijada a un soporte sólido en lugar del ADN problema, y es la muestra problema la que está marcada con un fluoróforo en lugar de la sonda. Miles de sondas diferentes están ancladas siguiendo un patrón de rejilla en un portaobjetos, que se sumerge en una solución que contiene el ADN problema marcado. El portaobjetos está dividido en miles de celdas, como los pixels de una imagen digital. Cada celda contiene millones de moléculas de una sonda en particular. La CGH utiliza la hibridación competitiva: el ADN de un paciente y el ADN de un control normal se marcan con dos fluoróforos diferentes, por ejemplo el paciente en verde y el control en rojo. Se mezclan los dos ADN marcados en igual proporción y se les permite que hibriden con las moléculas de sonda de cada celda del array.

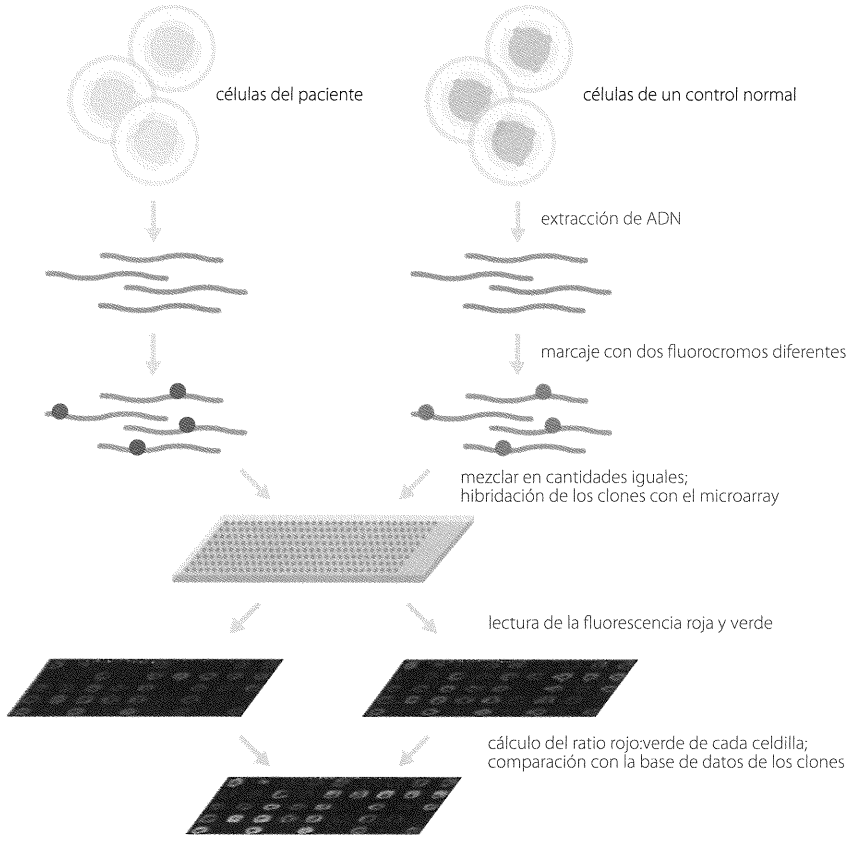


Figura 4.7 – Principios del CGH utilizando un microarray de clones genómicos (array-CGH).
Adaptado con permiso del original por el Dr Joris Veltman, Nijmegen.

Tras la hibridación y el lavado, los portaobjetos se observan al microscopio de fluorescencia para determinar las cantidades relativas de fluorescencia roja y verde. En las celdas donde la cantidad de las dos muestras es igual, esta tendrá fluorescencia amarilla. Las secuencias en las que una o las dos copias del paciente están delecionadas darán más fluorescencia roja, porque para esa secuencia hay relativamente más ADN control. Las duplicaciones dan lugar a celdas de color verde (*Figura 4.8*).

Los arrays de CGH tienen muchas aplicaciones. La disponibilidad de una enorme cantidad de clones caracterizados y mapeados con precisión, gracias al Proyecto Genoma Humano, permite un control total sobre la especificidad y la resolución del array de CGH. Los arrays pueden estar hechos para un cromosoma concreto, o para cubrir por entero el genoma. La resolución depende del número y tamaño de los clones utilizados, y de su distribución a lo largo del genoma. Debido a que cada clon está mapeado con precisión en la secuencia del genoma humano, cualquier deleción o duplicación detectada puede ser inmediatamente asociada a una lista de genes. La primera versión de los CGH utilizaba una extensión de cromosomas normales en un portaobjetos en lugar de un microarray. Esto ha sido sustituido por el array-CGH. El CGH es una herramienta de gran alcance, pero tiene dos limitaciones en el análisis clínico. No es capaz de detectar reordenamientos equilibrados como traslocaciones o inversiones, solo cambios en el número de copias, y es muy caro.

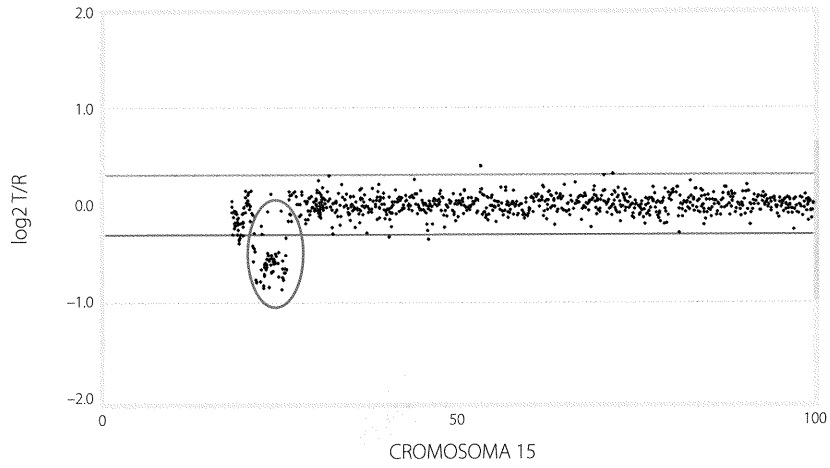


Figura 4.8 – Ejemplo de resultado de un array-CGH.
El ADN problema (marcado en verde) y el ADN control (marcado en rojo) se mezclaron e hibridaron en un microarray que contenía más de 30.000 sondas de cromosomas bacterianos artificiales (BAC), cada una con una localización cromosómica conocida. El ratio de señal verde y roja de cada celda del array está representado en el eje vertical. Los ratios que se encuentran por debajo del límite inferior normal indican deleción. Los resultados se distribuyen a lo largo del eje horizontal de acuerdo con la localización cromosómica de la sonda. En este ejemplo solo aparecen los resultados de sondas del cromosoma 15. El círculo muestra un grupo de clones contiguos en 15q11-q13 que presentan solo una copia en el ADN problema, indicando una deleción en heterocigosis. Cortesía del Dr. Joris Veltman, Nijmegen.

Cuadro 4.3

Endonucleasas de restricción

Estas enzimas bacterianas cortan la doble cadena de ADN siempre que encuentren una secuencia corta específica, normalmente de unas 4, 6 u 8 pb de longitud. Las bacterias las utilizan como parte de su mecanismo de defensa contra el ADN extraño. Una gran cantidad de enzimas de restricción han sido aisladas de muchas especies bacterianas. Cada una tiene su propia secuencia de reconocimiento; por ejemplo, la enzima EcoR1 corta GAATTC.

Para los biólogos moleculares, las enzimas de restricción son una herramienta muy útil por su capacidad de cortar la molécula de ADN de manera reproducible en fragmentos largos. Es fácil olvidar que todo lo que uno hace con el ADN implica una gran colección de moléculas idénticas. Por ejemplo, un *southern blot* necesita normalmente 5µg de ADN extraído de sangre. Una célula humana contiene 6,4 pg de ADN, por lo que 6,4 µg de ADN estarán contenidos en un millón de células. Así, el material de partida es una gran colección de moléculas idénticas. Si las enzimas de restricción no cortaran cada molécula exactamente en los mismos lugares, los fragmentos serían un revoltijo y no correrían como bandas bien definidas en un gel. El tamaño medio de los fragmentos dependerá de la enzima de restricción elegida. De media, un sitio de restricción de 4-pb aparecerá al azar cada 4^4=256 pb, mientras que uno de 6-pb aparecerá cada 4096 pb. Los sitios de restricción se distribuyen aleatoriamente en el ADN humano, por lo que habrá una gran variabilidad de tamaño de fragmentos alrededor de estos promedios.

Cuadro 4.4

Gel de electroforesis

Junto a la PCR, el gel de electroforesis es la herramienta más importante en genética molecular. Las moléculas de ADN tienen carga negativa debido a su grupo fosfato (ver *Cuadro 3.2*). En un campo eléctrico la molécula de ADN se moverá hacia el polo positivo. Si el ADN está en un gel de agarosa o poliacrilamida, las moléculas tienen que pelear durante todo el camino en una jungla de moléculas de polímero. La velocidad de movimiento de la doble cadena de ADN dependerá de su tamaño, y apenas en su secuencia. Las moléculas pequeñas se mueven rápido, las grandes lo hacen despacio y las de un tamaño determinado formarán un patrón de bandas. La posición del fragmento, revelado por hibridación o tinción, es una medida de su tamaño. El ADN de cadena simple, o las dobles hélices que contengan bases no emparejadas, muestran patrones de migración anómalos, que son la base de algunos métodos de detección de mutaciones.

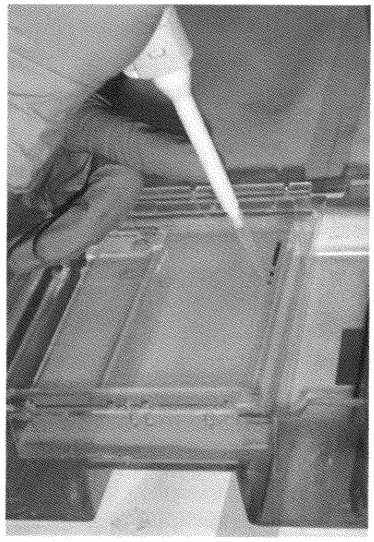


Figura – Cargando un gel de electroforesis.
Las muestras de ADN, mezcladas con un marcador azul, son pipeteadas en los pocillos de un gel de agarosa. El gel se sumerge en una solución tampón para enfriarlo y crear el contacto eléctrico.

Amplificación de secuencias de interés

Cuando la secuencia de interés ocupa solo una pequeña fracción de la muestra de ADN, puede hacerse visible y estudiarse mediante hibridación específica, como se explicó anteriormente. Por otro lado, puede estudiarse tras una amplificación selectiva. Antiguamente esto se hacía clonando la secuencia en células vivas, generalmente en la bacteria *E. coli*. Esto no permitía que el investigador tuviera muchas copias puras de la secuencia, sin contaminación de todo el ADN que estaba originalmente presente. Este método está descrito en el *Cuadro 4.5*. En la mayor parte de los protocolos clínicos se ha sustituido la clonación en células vivas por la PCR. Esta es una forma de clonación *in vitro*. Al igual que en la clonación convencional, funciona haciendo copias de la secuencia de interés, pero de manera más rápida y sencilla. A diferencia de la clonación convencional, el proceso de PCR no separa la secuencia amplificada de la mezcla original. Si es necesario esto puede hacerse en un proceso separado, pero en muchos protocolos no es necesario. La secuencia amplificada se encuentra en tal exceso que todo el producto puede considerarse como una preparación levemente impura de la secuencia de interés. La PCR tiene varias ventajas sobre la clonación in vivo: es más sencilla y rápida, pero lo más importante es que es selectiva. Con la PCR se puede elegir qué parte del ADN se quiere amplificar. Con la clonación in vivo se clona todo y luego se tiene que buscar entre los miles o millones de clones el que interesa.

Cuadro 4.5

Amplificación de una secuencia por clonación

Hasta mediados de los ochenta, la clonación era el único método para aislar un fragmento de ADN para su estudio. Se basaba en la idea de que si un fragmento de ADN era puesto en una célula de la manera correcta, y luego la célula crecía hasta formar una colonia de células hijas, cada una de estas contendría una copia del fragmento de interés. Las células que se utilizaban eran la bacteria *E. coli*, pero podían ser levaduras, células de mamífero u otros tipos.

La clonación requiere un **vector**. Introducir fragmentos de ADN en una célula es sorprendentemente sencillo, pero un fragmento de ADN insertado libre en una célula se degradará rápidamente y seguro que no se replicará cuando la célula se divida. Los vectores son trozos de ADN que contienen características que hacen que las células huésped permitan su presencia y su replicación. Son derivados de plásmidos o virus naturales. El fragmento a amplificar es ligado en el vector de tal manera que juntos forman una molécula de ADN recombinante de cadena sencilla. La ingeniería ha optimizado vectores para tareas específicas. Los vectores de ingeniería incorporan varios ajustes ingeniosos para identificar las células huésped que contienen al vector recombinante, y para aislar el ADN clonado una vez que las células huésped hayan crecido. Para los propósitos actuales lo más importante es que cada tipo de vector tenga el máximo tamaño para insertar el fragmento (*Tabla*). El tamaño máximo es siempre mucho menor a un cromosoma, y menor al tamaño de muchos genes humanos:

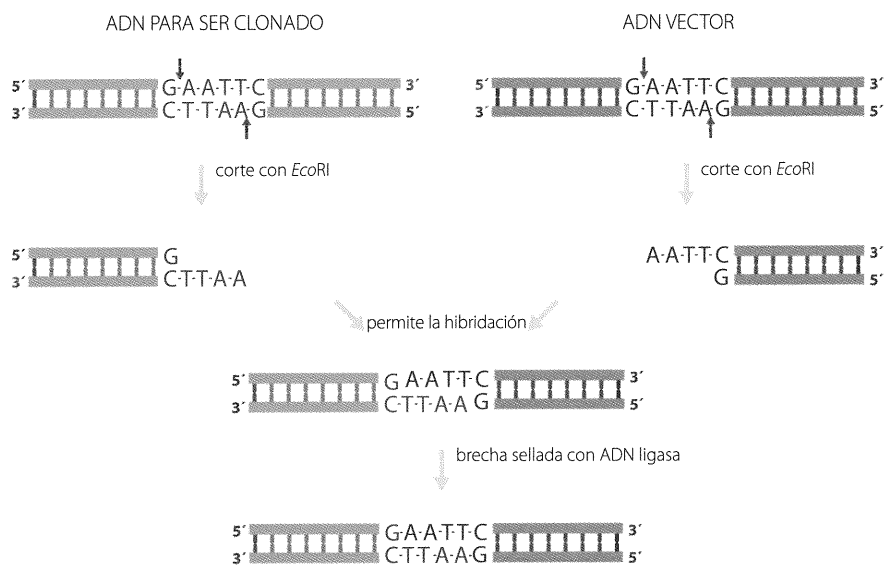
Algunos vectores utilizados para la clonación de fragmentos de ADN.

Vector	Célula huésped	Capacidad máxima de clonación	Comentarios
Plásmido	*E. coli*	5–10 kb	Vector simple para clonar pequeños fragmentos
Cósmido	*E. coli*	45 kb	Vector simple para clonar pequeños fragmentos
Cromosomas bacterianos artificiales (BAC)	*E. coli*	150 kb	Caballo de batalla del Proyecto Genoma Humano
Cromosomas de levaduras artificiales (YAC)	Levadura	1000 kb	Técnicamente difícil; solo con fines especiales

La capacidad de cortar y unir el ADN depende de las endonucleasas de restricción y de otras enzimas, las ADN ligasas. Muchas enzimas de restricción hacen un corte escalonado cuando cortan la doble hélice, dejando pequeñas cadenas sencillas ("extremos pegajosos") cohesivas. Los fragmentos complementarios con extremos cohesivos pueden hibridar extremo con extremo (ver figura). La ADN ligasa une las cadenas cohesivas con una unión química covalente.

La clonación es un proceso básicamente aleatorio. Una gran cantidad de moléculas de ADN problema se rompen en fragmentos aleatorios que son incorporados en masa en millones de vectores que infectan a millones de células huésped. Los vectores son herramientas de ingeniería, por lo que las células que contengan el vector recombinante pueden ser seleccionadas, normalmente gracias a un patrón de resistencia a un antibiótico particular. Luego, cada célula es recogida y utilizada para formar colonias. Cada colonia es una inagotable fuente de un fragmento específico de ADN. La colección de colonias resultante se denomina **librería** y contendrá ejemplos clonados de cada secuencia problema. Librería es un nombre muy engañoso porque en una librería los libros están ordenados en estanterías y existe un catálogo

Cuadro 4.5 - Continuación



Creación de una molécula ADN recombinante.
Dos moléculas diferentes son asimiladas con el mismo enzima de restricción para crear extremos pegajosos complementarios. Se hibridan y permanecen unidos por la ADN ligasa.

que está para buscar cualquier libro que se precise. Las librerías recombinantes deberían llamarse almacenes, que pueden tener o no lo que se necesite.

Durante 1970-1990, el índice de progreso de la genética molecular humana estuvo determinado en gran medida por qué clones de interés se podían encontrar utilizando librerías de búsqueda. Hoy de en día el Proyecto Genoma Humano ha permitido tener disponible una colección completa de clones BAC perfectamente caracterizados y mapeados que abarcan el genoma completo. También tenemos una manera de amplificar fragmentos de ADN concretos del genoma de un paciente por PCR. Como resultado, hacer y estudiar librerías de ADN recombinante ha dejado de ser parte importante en la investigación clínica, pero sigue siéndolo en la actividad investigadora.

La reacción en cadena de la polimerasa

Antes de la PCR, solo los investigadores expertos podían amplificar y caracterizar el ADN. Hacia 1990, los métodos mejorados de la PCR permitieron que la amplificación selectiva de secuencias procedentes de muestras de pacientes se convirtiera en una herramienta de rutina en laboratorios de diagnóstico.

La PCR se basa en tres características de la replicación del ADN.

(1) Una nueva cadena necesita un **cebador (primer)**. La ADN polimerasa (la enzima que replica el ADN sintetizando la cadena complementaria a un molde de cadena sencilla) no puede empezar a unir simplemente nucleótidos libres; solo puede trabajar extendiendo una cadena existente. Los cebadores utilizados en la PCR son sintetizados químicamente como cadenas sencillas de oligonucleótidos, de unos 20 nt de longitud.

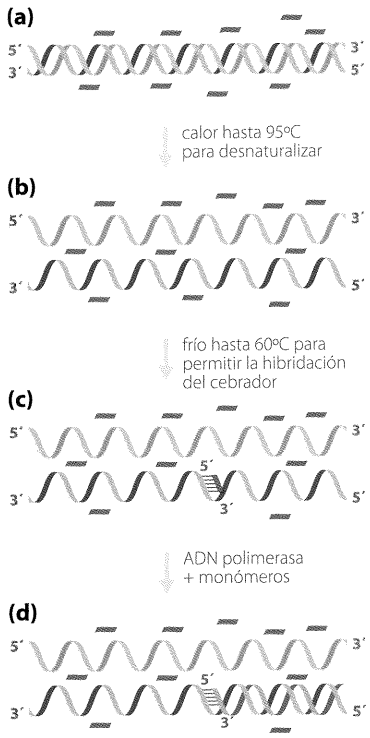


Figura 4.9 – Utilización de cebadores sintéticos para forzar a la ADN polimerasa a sintetizar solo la cadena complementaria de una zona específica de la gran molécula de ADN.
(a) El cebador (en rojo) está presente en exceso. (c) Hibrida solo con una secuencia específica. (d) Solo la secuencia que se encuentra por debajo del cebador es copiada.

(2) La extensión de la cadena solo puede hacerse en sentido 5′→3′ (ver *Cuadro 3.2*).
(3) Las dos cadenas de ADN de doble hélice son antiparalelas, como se muestra en la *Figura 3.5a*.

La necesidad de un cebador hace posible forzar a la polimerasa para que copie solo una secuencia seleccionada en una muestra de ADN humano. Se utiliza un sintetizador químico de oligonucleótidos para crear un gran número de moléculas de un oligonucleótido específico de cadena sencilla; esta secuencia hibridará solo con una secuencia determinada del ADN humano. El cebador es añadido en exceso al ADN. Esta mezcla se desnaturaliza gracias a un calentamiento rápido a 95 °C, luego se enfría a una temperatura en que la hibridación pueda tener lugar (normalmente 55-60 °C). Algunas de las dobles hélices originales se volverán a unir, pero como hay muchas más moléculas de cebador, la secuencia específica del cebador quedará en la mayoría de los casos hibridada a este, en lugar de a su cadena complementaria. Si el material de partida es ADN procedente de muchas células, como suele ser el caso, algunas copias de la secuencia específica pueden haber hibridado entre sí, pero la mayoría habrá hibridado con el cebador. Si se permite entonces a la ADN polimerasa presente en la mezcla que actúe, su acción principal será añadir nucleótidos libres a extremo 3′ del cebador, construyendo la cadena complementaria de un pequeño trozo de ADN genómico. La *Figura 4.9* resume el proceso.

La PCR utiliza este principio, pero convierte la reacción lineal de la *Figura 4.9* en reacción exponencial en cadena utilizando dos cebadores y múltiples ciclos de desnaturalización, hibridación y síntesis. La *Figura 4.10* muestra cómo funciona. Los cebadores hibridan de manera específica en las cadenas complementarias del ADN a ambos lados de la secuencia a amplificar, y están orientados de tal forma que la extensión de la cadena 5′→3′ desde cada cebador llega hasta el otro. Además, cada cadena sintetizada desde el cebador *forward* se extiende hasta incluir a la secuencia donde el cebador *reverse* puede hibridar, y cada cadena hecha por extensión desde el cebador *reverse* llega a incluir la secuencia a la que se une el cebador *forward*. En el *Cuadro 4.6* se explica el proceso con más detalle.

La PCR tiene algunas limitaciones:

- Se necesita conocer suficientemente la secuencia para poder diseñar cebadores específicos.
- La PCR funciona muy bien amplificando secuencias de 100-400 pb. Secuencias mayores a 1-2 kb son muy difíciles, y secuencias superiores a 20 kb casi siempre son imposibles de amplificar.

Al final de la reacción de PCR, aunque todo el ADN original irrelevante se mantiene, la secuencia amplificada está presente en tal cantidad que el producto puede ser tratado como una preparación específica con ligeras impurezas.

Al igual que en el *Southern blotting*, la PCR puede ser utilizada para detectar la presencia o ausencia de una secuencia o para medir su tamaño. A continuación se muestran ejemplos de ambas aplicaciones. Además, los productos de la PCR sirven para secuenciar y buscar mutaciones puntuales, como veremos en el *Capítulo 5*.

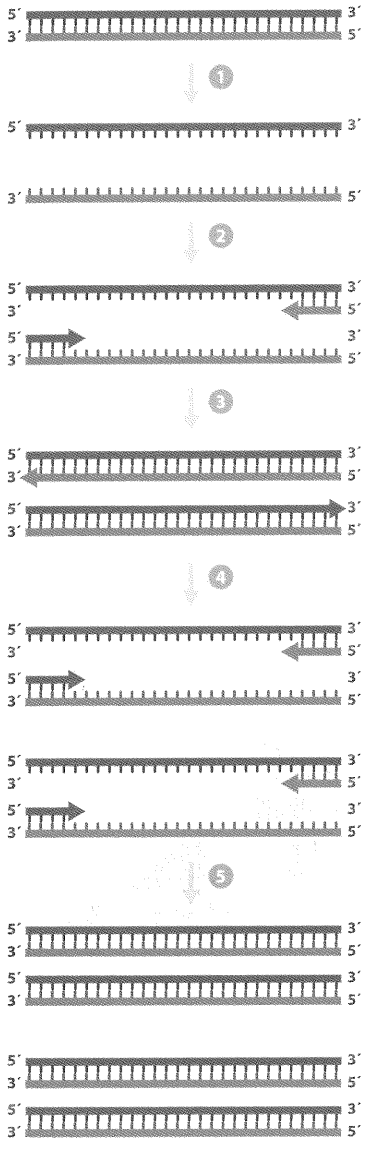


Figura 4.10 – Principio de la PCR. La reacción de la PCR contiene un ADN diana, la enzima ADN polimerasa, grandes cantidades de ambos cebadores y un suplemento de mononucleótidos. (1) El ADN de partida es desnaturalizado por calentamiento a 95 °C. (2) A 55-60 °C los cebadores se unen a sus secuencias diana. Tenga en cuenta la dirección 5′→3′. (3) A 72 °C la polimerasa extiende el cebador en dirección 5′→3′. (4) Desnaturalización y anillamiento de los cebadores. (5) Polimerización. Tras dos pasos de PCR tendremos 4 cadenas.

Cuadro 4.6

Entender la PCR

En cada paso de desnaturalización, hibridación y síntesis, se replica no solo el molde original, sino las copias que se hayan hecho en ciclos anteriores. Así, la cantidad de ADN diana es duplicada en cada ciclo; 20 ciclos de PCR serán suficientes para amplificar la secuencia diana un millón de veces. Los ciclos de PCR se controlan variando la temperatura. Unos segundos a 95 °C lo desnaturalizan todo. Luego unos pocos segundos a unos 55-60 °C permiten que el cebador se una a todo el molde posible. Finalmente unos segundos a 72 °C, hacen que cada cebador se extienda añadiendo nucleótidos al extremo 3′. Para una amplificación normal se necesitan 20-25 ciclos con pasos de 30-60 segundos que se puede realizar en menos de dos horas. Para llevarla a cabo se utiliza un termobloque programable en el que se pueden poner 20 o más tubos de reacción individuales, por lo que la PCR puede amplificar en paralelo.

La especificidad de la PCR depende de la existencia de cebadores que se unan solo al ADN diana deseado y no a cualquier secuencia. La especificidad necesaria se alcanza utilizando cebadores cortos (18-20 nt) y escogiendo muy bien la temperatura. Si la temperatura de anillamiento es demasiado baja, los cebadores serán capaces de hibridar en lugares que no les corresponda, mientras que si es demasiado elevada no será capaz de hibridar. La temperatura que se encuentra en un rango de 55-60 °C permite una hibridación específica. Los posibles cebadores puestos son a prueba contra una base de datos de todo el genoma para que no exista otra secuencia a la que se pueda unir. El tamaño y la composición de nucleótidos del cebador pueden afectar a la eficiencia de la PCR.



Un termociclador típico utilizado para realizar la ampliación PCR. Cuando está en funcionamiento, una tapadera insuladora cubre los tubos.

Cuando piense qué está ocurriendo en la PCR es útil recordar en las dos clases de productos de PCR:

- El Producto A es sintetizado utilizando el ADN original como molde. Las moléculas del Producto A tienen un extremo 5′ bien definido (el extremo 5′ del cebador) una longitud indeterminada.

Cuadro 4.6 – Continuación

- El Producto B se sintetiza utilizando al Producto A como molde. Ambos extremos del Producto B están definidos. El extremo 5´ es el extremo 5´ que el cebador ha hecho, y el extremo 3´ está definido por el extremo de su molde (el extremo 5´ del Producto A). Todas las moléculas de Producto B son exactamente del mismo tamaño.

En ciclos más tardíos de la reacción de PCR, el Producto B es utilizado como molde para los próximos ciclos de síntesis (*Tabla*). El extremo de la cadena hecha por extensión del cebador 1 es complementaria al 2, por lo que en el siguiente ciclo el cebador 2 puede hibridar con ella y sintetizar una cadena complementaria. El extremo de esta cadena, es complementario al cebador 1. La nueva cadena sintetizada es idéntica al molde. Después de los primeros ciclos, la mayor parte del producto se realiza utilizando al Producto B como molde.

La mejor forma de entender cómo funciona la PCR es coger una hoja de papel grande y dibujar en ella qué es lo que ocurre en los primeros tres o cuatro ciclos de la reacción. Puede comprobar su esfuerzo con la *Figura 4.10*. Hay que marcar los extremos 3´ y 5´. Asegúrese de que las cadenas hibridadas son siempre antiparalelas y que la cadena se extiende 5´→3´.

Avance de la reacción de PCR.

	ADN de partida	**Producto A. El molde es el ADN de partida; 1 extremo definido**		**Producto B. El molde puede ser el producto A o el producto B; 2 extremos definidos**		
	Cadenas sencillas	Fabricado en este ciclo	Total acumulado	Fabricado en este ciclo utilizando A como molde	Fabricado en este ciclo utilizando B como molde	Total acumulado
Después de 1 ciclo	2	2	2			
Después de 2 ciclos	2	2	4	2	–	2
Después de 3 ciclos	2	2	6	4	2	8
Después de 4 ciclos	2	2	8	6	8	22
Después de 5 ciclos	2	2	10	8	22	52

Imaginemos que empezamos con una molécula de doble cadena de ADN. Tras los primeros ciclos, casi todo el producto consiste solo en una secuencia entre los extremos exteriores de los cebadores. Los números son el número de cadenas sencillas que hay cuando todo el ADN es desnaturalizado.

4.3. **Estudio de pacientes**

Consideraremos primero los casos estudiados por hibridación. Las regiones de ADN implicaron una variedad: desde un solo nucleótido en el primer caso pasando por trozos mas grandes de genoma, hasta el cuarto caso con el genoma completo. En los últimos tres casos se utilizó la PCR para comprobar la presencia o ausencia de una secuencia y para calcular su tamaño. En el *Capítulo 5* veremos ejemplos de cómo utilizar la PCR para comprobar una secuencia de nucleótidos.

Casos estudiados utilizando un protocolo de hibridación

CASO 11 | Familia Kavanagh | 81 | **97** | 152

- Primer hijo sano
- Segundo hijo, Celia, pálida con bajos niveles de hemoglobina
- Anemia falciforme

La anemia falciforme es una enfermedad causada por la sustitución de un nucleótido en el exón 1 del gen de la β-globina localizada en el cromosoma 11. Esto cambia un aminoácido glutamina por valina. La hemoglobina está formada por dos cadenas α-globina y β-globina (más cuatro grupos hemo). La sustitución de un aminoácido en la β-globina afecta a las propiedades de la hemoglobina, haciendo que se agregue y se distorsionen los glóbulos rojos. Los heterocigotos tienen el rasgo falciforme, pero normalmente están sanos. Los homocigotos tienen anemia falciforme, una enfermedad autosómica recesiva. La anemia falciforme y el rasgo falciforme son muy definibles con un análisis hematológico rutinario; no se necesitan análisis de ADN para realizar el diagnóstico. Sin embargo, para realizar un diagnóstico prenatal se requiere analizar el ADN. Obtener sangre fetal es difícil, no se puede realizar en todos los centros y puede tener riesgos para el embarazo; de todas formas el feto produce β-globina en lugar de γ-globina.

Existen varios métodos alternativos para comprobar la mutación de la anemia falciforme. La técnica utilizada aquí es el *dot-blot* con dos oligonucleótidos alelo específicos (ASOs) para distinguir las secuencias normales y las de la anemia falciforme. Algunos de esos métodos serán discutidos en el *Capítulo 5*.

La secuencia normal del gen de la β-globina es (solo un extracto):

CTGACTCCTGAGGAGAAGTCTG

Mientras que la versión mutada que causa la anemia:

CTGACTCCTGTGGAGAAGTCTG

Se obtuvo el ADN fetal de 11 semanas mediante biopsia coriónica (ver *Capítulo 14*). Para aumentar la sensibilidad del análisis, el fragmento que contenía el gen de la β-globina fue amplificado por PCR. El producto de la PCR fue desnaturalizado y puesto formando puntos sobre dos tiras de membrana de nitrocelulosa junto a muestras control de genotipo conocido (*Figura 4.11*). Se sumergió una de las membranas en una solución que contenía cada una de las sondas marcadas. El resultado mostraba que el feto era heterocigoto para la mutación y, por lo tanto, no tendría anemia falciforme.

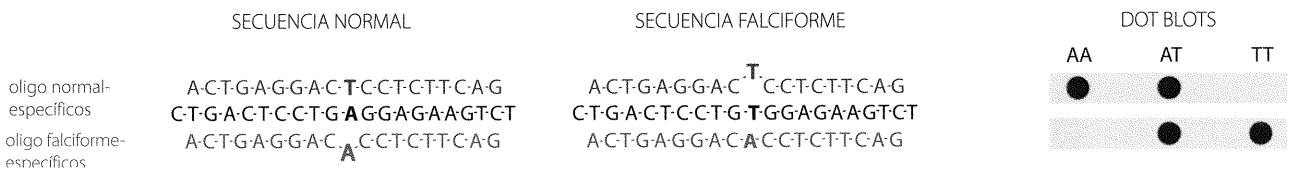


Figura 4.11 – *Dot blot* para la anemia falciforme.
El ADN desnaturalizado del feto es inmovilizado en una hoja de plástico y se comprueba si hibrida con oligonucleótidos marcados específicos para secuencia normal y secuencia falciforme.

Este caso es una lección para los planificadores de los servicios de salud. La intervención genética alcanzó el mejor de los resultados posibles: una pareja preocupada fue tranquilizada, se evitó un aborto y nació un niño sano. Sería una ligereza marcar el resultado de la intervención genética como "sin acción". Los genetistas clínicos son muy conscientes de no medir sus logros por el número de fetos anormales diagnosticados y abortados.

CASO 12 | Familia Lawton | 82 | **98** | 376

- Historia familiar de hemofilia
- Lactante varón, Lennox, con cefalohematoma

La Hemofilia A está causada por mutaciones en el gen *F8*, del cromosoma Xq28, que codifica el Factor VIII de la cascada de coagulación sanguínea. En el *Ejercicio 3* del *Capítulo 1* se muestra un árbol genealógico típico con patrón de herencia recesiva ligada al X. Diferentes familias tienen distintas mutaciones en este gen, pero alrededor del 40% de todos los casos graves están causados por una inversión que implica a 500 kb de ADN. El punto de rotura está dentro del gen F8. Su efecto impide la producción de Factor VIII (*Figura 4.12*). Debido a que el punto de rotura está en el intrón 22, de 32 kb, y toda la secuencia del gen está presente, cada exón puede ser amplificado por PCR, obteniéndose la secuencia correcta. Se puede utilizar un *Southern blot* para estudiar el fragmento de gran tamaño de ADN que se produce en la región de habitual de rotura. Si la inversión está presente el fragmento tendrá un tamaño anormal (*Figura 4.13*).

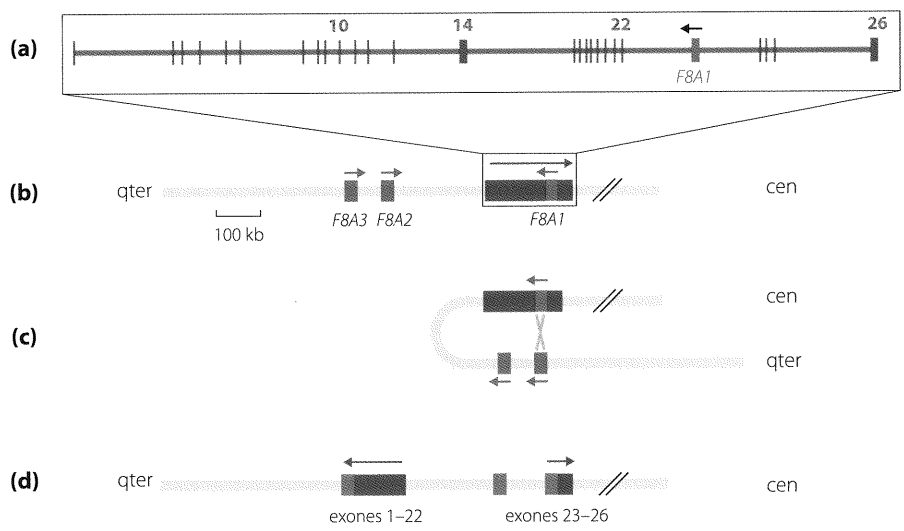


Figura 4.12 – Inversión que interrumpe el gen.
(a) El gen *F8* tienen 26 exones y ocupa 187 kb de ADN genómico en el cromosoma X con localización Xq28. (b) En los cuadros rojos se muestra la secuencia del intrón 22 del gen *F8*, donde se localizan dos copias adicionales den 360 y 435 kb desde el inicio del gen. Las flechas muestran la orientación. Nota: estas copias adicionales son repeticiones invertidas (comparadas con las repeticiones en el *Cuadro de enfermedad 3*, donde son repeticiones directas). (c) Durante la meiosis masculina esta parte del cromosoma X no se puede emparejar. El ADN puede doblarse para que dos copias de la secuencia repetida se apareen en la misma orientación. A veces se produce recombinación entre secuencias emparejadas. (d) El resultado es una inversión cromosómica de unos 500 kb de ADN que interrumpe el gen *F8*.

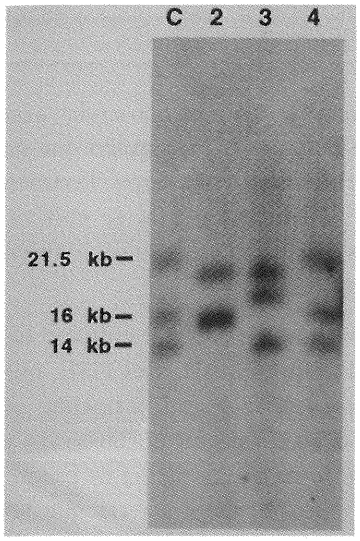


Figura 4.13 – Detección de la inversión *F8* por *Southern blot*.
El ADN genómico ha sido digerido con la enzima de restricción *Bcl1*, se corre en un gel de agarosa y se hace el *Southern blot* sobre una membrana de nitrocelulosa. Se hibrida el filtro con una sonda que contiene la secuencia F8A1 del intrón 22. En los carriles c (control normal) y 4 (paciente con una mutación en *F8*) la autorradiografía muestra bandas de 21,5, 16 y 14 kb, que representan los fragmentos contenidos en las secuencias F8A1, F8A3 y F8A2 respectivamente. En el carril 2 las bandas 21,5 y 14 están alteradas, mostrando que el ambiente ha cambiado por recombinación entre F8A1 y F8A3, como en la *Figura 4.12*. En el carril 3 las bandas 21,5 y 16 han cambiado por recombinación entre F8A1 y F8A2. Reproducido de Lakich *et al.*, (1993) (*Nature Genetics* **5**:238) con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

CASO 7 — Familia Green — 25 — 38 — 68 — **99** — 376

- Gillian (niña), 3 años de edad
- Desarrollo lento
- ? Alteración cromosómica
- Petición de análisis de microdeleción 22q11

Aunque la citogenética tradicional mostraba un cariotipo normal (*Figura 2.9*), esta no es capaz de distinguir deleciones o duplicaciones menores a 3-5 Mb de resolución en preparaciones rutinarias. El aspecto de Gilllian sugería una deleción de la banda 22q11. Esta deleción está causada por recombinación mal alineada de secuencias repetidas de baja copia en 22q11, como se explicaba en el *Cuadro de enfermedad 3*. La deleción más común ocupa unas 3 Mb e incluye unos 20 genes. Uno de estos es el gen *TUPLE1*. Se utilizó una sonda con la secuencia *TUPLE1* para realizar un FISH en una preparación de los cromosomas de Gillian. El resultado mostró una deleción en uno de los cromosomas 22, confirmando el diagnóstico (*Figura 4.14*).

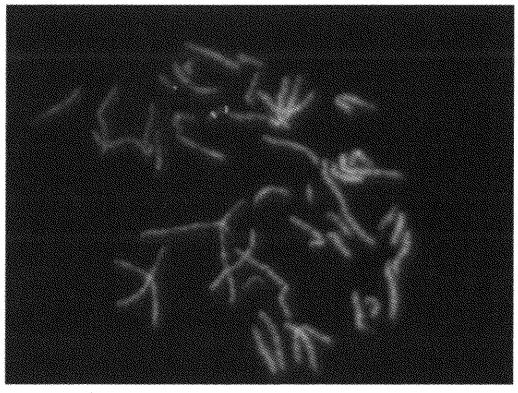


Figura 4.14 – 22q11 metafase FISH.
Los puntos verdes son la sonda control, utilizada para identificar el cromosoma 22 y confirmar la hibridación. Los puntos rojos son la sonda *TUPLE1*. Solo una de las dos copias del cromosoma 22 contiene la secuencia que hibrida con la sonda.

CASO 8 | Familia Howard | 26 | 38 | 68 | **100** | 275 | 376

- Helen, hija recién nacida de Henry y Anne (33 años)
- Síndrome de Down
- ¿Riesgo de recurrencia si tienen más hijos?

A la madre de Helen se le ofreció un análisis prenatal en su próximo embarazo. Aunque el riesgo de recurrencia en el síndrome de Down es bajo, alguien que ya haya tenido un hijo afecto estará ansioso en los siguientes embarazos. También la espera hasta el análisis resulta muy estresante. La muestra fetal se cultiva, por lo que se necesitan al menos dos semanas para que las células se dividan en número suficiente para un análisis cromosómico convencional.

Existen dos métodos que permiten resultados rápidos sin tener que cultivar las células: la QF-PCR, descrita en una sección final de este capítulo, y el FISH, que fue utilizado en este caso (*Figura 4.15*). Como se describió anteriormente, se desnaturaliza el ADN de células que no están en división en un portaobjetos y se hibrida con una sonda fluorescente para el cromosoma 21. La media de puntos fluorescentes, calculada en más de 50 células, era de 1,8. Esto sugería que las células fetales tenían dos copias del cromosoma 21, aunque la hibridación puede fallar en algunos casos.

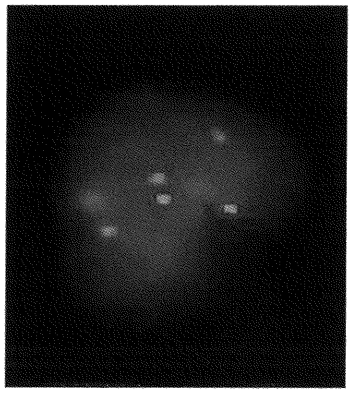


Figura 4.15 – FISH de interfase para trisomía 21.
La sonda del cromosoma 21 está marcada con un fluorocromo rojo y la sonda control (para el cromosoma 18) está marcada en verde. Los dos puntos verdes muestran que en la célula ha funcionado la hibridación y los tres puntos rojos muestran que existen tres copias del cromosoma 21. El informe clínico se basa en examinar un gran número de células. En diagnóstico prenatal se suele utilizar una mezcla de sondas de diferentes colores para los cromosomas 13, 18, 21, X e Y.

CASO 13 | Familia Murphy | 83 | **100** | 376

- Lactante femenino, Michelle, con rasgos dismórficos
- ? Anomalía cromosómica no equilibrada

Como en el caso de Gillian Green, la hija de los Murphy tenía características que sugerían una anomalía cromosómica, pero no se detectaba en el análisis citogenético convencional. La combinación de retraso mental y características dismórficas que presentaba Michelle no sugerían que se tratase de ningún síndrome característico, por lo que no era posible decidirse por una sonda de FISH que pudiera dar con la causa. En su lugar se utilizó un array CGH. En aproximadamente el 10% de casos similares esta técnica identifica deleciones o duplicaciones cromosómicas submicroscópicas.

Las anomalías concretas varían mucho entre los diferentes casos. Se extrajo ADN sanguíneo y se envió la muestra. El resultado (*Figura 4.16*) muestra una duplicación de material en 12q24.1. El ADN de Michelle muestra un incremento de dosis en 39 clones contiguos del 12q24.1 en el microarray de CGH. El tamaño de la duplicación puede ser estimado comparando la localización precisa de esos 39 clones con la secuencia del genoma humano. Los datos sugieren que la duplicación de Michelle implica a 2,3 Mb de material.

Antes de comunicar los resultados a los padres de Michelle, era importante decidir si la duplicación era o no la causa de sus problemas. Como cada vez se ana-

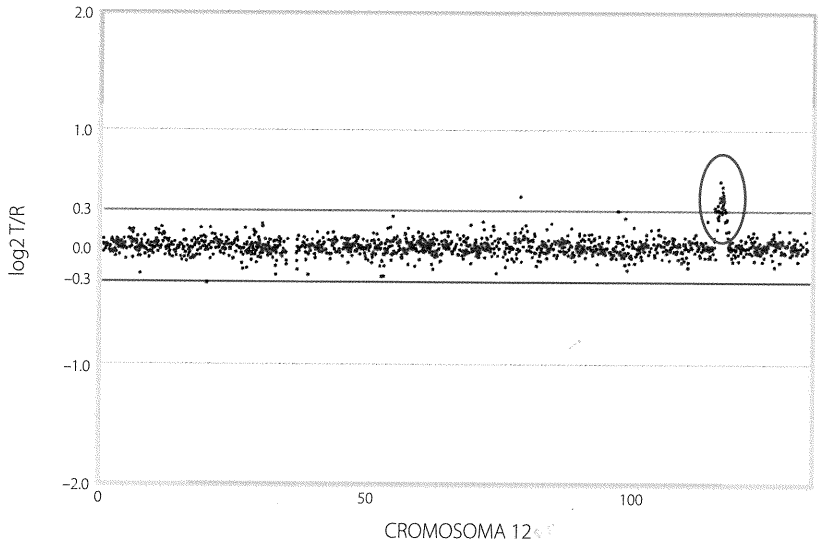


Figura 4.16 – Resultado del array CGH en la paciente de la *Figura 4.3.*
El genoma entero fue supervisado, pero solo se muestran los resultados para las sondas del cromosoma 12. Hay una duplicación que afecta los 39 clones contiguos a 12q24.1. Cortesía del Dr. Joris Veltman, Nijmegen.

lizan más muestras con arrays de CGH, ha llegado a ser evidente que algunos segmentos cromosómicos pequeños presentan variaciones de número de copia en la población normal. La duplicación de Michelle no era uno de los polimorfismos conocidos sin patología, pero podía ser uno nuevo.

La primera cuestión era saber si alguno de los padres era portador de la duplicación, o si por el contrario había aparecido *de novo* en Michelle. Siendo sus padres normales, si alguno de ellos tenía la duplicación, esta no podía ser la causa de los problemas de Michelle.

El resultado fue que era un hecho *de novo*. Esto no probaba que fuera patológico, pero lo hacía más probable. Se realizó una búsqueda de la secuencia en una base de datos para comprobar si la duplicación implicaba algún gen que en dosis elevadas pudiera producir problemas clínicos. No se identificó un candidato claro, pero la duplicación implicaba a un gran número de genes, haciendo bastante plausible que pudiera producir estos efectos. La gran cantidad de probabilidades hacía pensar que esto era lo que causaba los problemas de Michelle, una conclusión importante porque sugería que el riesgo de recurrencia era muy bajo. La duplicación era un suceso *de novo* y no había nada que sugiriera un factor en cualquiera de los padres que pudiera predisponer a la recurrencia. El consejo genético fue que el riesgo de recurrencia no era cero pero sí muy bajo. Debido a que no se conocían todos los factores, no era posible precisar más el riesgo; de todas formas era pequeño en comparación con el riesgo general de un problema inherente a cualquier embarazo.

Casos estudiados utilizando PCR

CASO 9 | Familia Ingram | 26 | 41 | 68 | **102** | 182 | 376

- Isabel, primera hija de Ian e Irene
- Talla baja aunque sus padres son altos
- ? Síndrome de Turner

El diagnóstico de Isabel se estableció claramente a partir de su cariotipo (*Figura 2.13*). Sin embargo, como se explicó en el *Capítulo 2*, es importante comprobar si tiene alguna célula 46,XY, ya que en las gónadas estas células se pueden transformar en malignas. Pueden aparecer si la causa del síndrome en el caso de Isabel fue la pérdida del cromosoma Y durante una división mitótica temprana de un embrión 46,XY. Para comprobar la presencia de células XY se realiza una reacción de PCR utilizando unos cebadores específicos del cromosoma Y para ver si aparece producto. Este es un método mucho más sensible que buscar células XY en una preparación de citogenética convencional. El análisis ideal sería con tejido procedente de su cintilla gonadal, porque este es el que podría desarrollar malignidad, pero normalmente se realiza en muestras de sangre.

En el caso de Isabel, no se pudo amplificar secuencia del cromosoma Y, lo que nos asegura que es improbable que tuviera células XY en sus gónadas.

CASO 4 | Familia Davies | 4 | 10 | 66 | **102** | 151 | 181 | 279 | 376

- Niño (Martin), edad 24 meses, padres Judith y Robert
- Torpe y lento al caminar
- Historia familiar de distrofia muscular
- Árbol genealógico muestra herencia recesiva ligada al X
- Petición de análisis de ADN

Como vimos en el *Capítulo 1*, Martin tenía características que sugerían un DMD (debilidad muscular y pseudohipertrofia de los gemelos). El árbol genealógico reforzaba esta sospecha porque había dos tíos que tenían una enfermedad neurodegenerativa progresiva. Los genetistas habían conseguido sus historias clínicas. Los resultados de su curso clínico y de la histología muscular coincidían con DMD. El neurólogo tomó una biopsia del músculo de Martin y una muestra de sangre para medir los niveles de creatinina quinasa (CK). La CK es una enzima presente en las células del músculo. Si existe daño en la membrana externa de la célula la CK se escapa hacia fuera. A menudo el nivel de CK aumenta en personas normales tras un ejercicio intenso y tiende a estar elevado en mujeres portadoras de DMD (puede servir como indicador probabilístico del estatus de la mujer portadora). En niños varones afectados se encuentra elevada.

Estos análisis confirmaron las malas noticias: Martin tenía distrofia muscular de Duchenne. Hoy en día no existe cura para esta enfermedad, solo tratamiento sintomático, y su pronóstico es grave. Es poco probable que Martin viva más allá de los 20 años a no ser que durante este tiempo se desarrolle un tratamiento efectivo (las perspectivas de la terapia génica están razonadas en el *Capítulo 14*). Inicialmente los padres de Martin, Judith y Robert, estaban preocupados con el shock emocional y con el planeamiento de cómo hacer frente lo mejor posible a un niño con una enfermedad grave progresiva. Por supuesto el diagnóstico también tenía implicaciones para cualquier futuro embarazo y para toda la familia. Cuando estuvieron preparados para considerar todos los puntos, los genetistas prepararon una sesión de consulta. Era muy probable que Judith fuera portadora; en tal caso cualquier hijo varón futuro tendría un riesgo de 1 a 2. Otras mujeres de la familia podían ser portadoras. Para resolver cualquiera de estas cuestiones había que identificar una mutación en el gen de la distrofina en Martin.

Como vimos en el *Capítulo 3*, el gen de la distrofina es enorme, pero unos dos tercios de las mutaciones son deleciones de uno o más exones completos (ver *Figura 3.9*). Estas deleciones son relativamente fáciles de detectar en varones afectos. Si no se encuentra deleción, no descartaría el diagnóstico porque un tercio de los casos tienen mutaciones puntuales o duplicaciones que pueden no ser detectadas por este análisis, por lo que se necesitarían otros más complejos.

Esta es una enfermedad ligada al X, por lo que un niño solo tiene una copia del gen de la distrofina. Para comprobar deleciones parciales, se amplifican individualmente exones del gen por PCR. Los 79 exones están por debajo de los 300 pb (excepto el exón 79, el último exón, que tiene 2703 pb; el último exón normalmente es el más largo de un gen, pero principalmente consiste en una región 3′ que no se traduce). Así, cada exón individual tiene un tamaño adecuado para ser amplificado por PCR. Se diseñan los cebadores para que encajen secuencias en los intrones que flanquean un exón de tal manera que el producto contenga el exón completo y algo de secuencia intrónica. Amplificando con cuidado 18 exones elegidos se consigue averiguar el 98% de las deleciones. Variando la cantidad de intrón incluida, los cebadores están diseñados de tal manera que cada exón da un producto de diferente tamaño. Se realizan una serie de reacciones de PCR en una sola operación (multiplex) utilizando todos los pares de cebadores juntos en el mismo tubo de reacción. La mezcla de productos de todas las amplificaciones de las PCR se corre en un gel y muestra un patrón de bandas en escalera (*Figura 4.17*).

El resultado (*Figura 4.17, Carril 5*) muestra que Martin tiene una deleción de los exones 45, 47 y 48. Los exones 43 y 50 están presentes. Se comprobaron los exones 44, 46 y 49 mediante PCR individuales, que mostraron que los exones 44

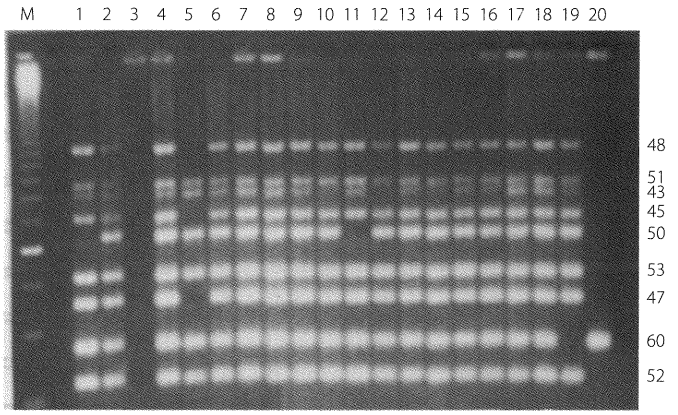


Figura 4.17 – Búsqueda de deleciones para la distrofia muscular de Duchenne. Nueve exones seleccionados del gen de la distrofina han sido amplificados desde muestras de ADN de 20 niños afectos. Cuando el producto se corre en un gel de electroforesis cada exón da lugar a una banda con un tamaño característico. Debido a que los niños solo tienen un cromosoma X, cualquier deleción da lugar a la pérdida de una banda. Las diferentes deleciones de exones pueden verse en los carriles 1, 5, 11, 12, 19 y 20. En el carril 3 puede haber una gran deleción o un fallo en la técnica. El niño sin deleciones en este gel puede tener otros de los 79 exones de la distrofina delecionados, o puede tener mutaciones puntuales o duplicaciones que causan pérdida en la función del gen.

y 46 estaban delecionados, pero que el 49 estaba presente. Así que la deleción de Martin englobaba a los exones 44-48. La implicación de esta deleción en la función del gen de la distrofina se discutirá en el *Capítulo 6*.

Ahora que sabemos qué mutación se está segregando en esta familia, se puede ofrecer un análisis a las mujeres para saber si son portadoras y si es necesario un diagnóstico prenatal. Judith y su madre son portadoras obligatorias (ver árbol genealógico en *Figura 1.10*) y la familia incluye al menos ocho mujeres que pueden serlo.

Las dos hijas de Judith y las dos hijas de su hermana son demasiado jóvenes para realizar ninguna intervención. Cuando se encuentren en la adolescencia se volverá a conectar con ellas. A través de Judith se sugirió a sus tres hermanas y sus dos primas (las hijas de la hermana de su madre) que contactaran con los genetistas. El análisis de portadora en mujeres es más complicado que el análisis en niños varones porque la portadora será heterocigota y cada exón del gen de la distrofina amplificará su cromosoma X normal.

Se requiere hacer un análisis cuantitativo, como el que se describe en la sección final de este capítulo y en el *Capítulo 5*. Antes de que el análisis estuviera disponible, muchas mujeres portadoras optaron por determinar el sexo de sus fetos y abortar todos los que fueran masculinos, incluso cuando solo hay una probabilidad de 1 entre 2 de que estuvieran afectados. Con el diagnóstico prenatal se puede estar seguro, si el diagnóstico es normal, de dar a luz niños libres de la enfermedad.

CASO 1 | Familia Ashton | 1 | 7 | 65 | **104** | 150 | 376

- John 28 años hijo de Alfred Ashton
- ? Enfermedad de Huntington
- Otros familiares con síntomas similares
- Se muestra una herencia autosómica dominante en el árbol genealógico
- Petición de análisis diagnóstico

El siguiente paso en la investigación de esta familia es realizar un análisis diagnóstico al padre de John, Alfred. Alfred ya muestra signos de la enfermedad. Aunque parece muy probable que la enfermedad que padece la familia (árbol genealógico en *Figura 1.7*) sea la enfermedad de Huntington, es necesario estar seguro antes de darle a John el consejo genético o proponerle una prueba predictiva de la enfermedad. Su médico obtuvo una muestra de 10 ml de sangre de Alfred y lo envió al laboratorio donde se extrajo el ADN.

Como se mencionó en el capítulo anterior, el laboratorio medirá el número de codones de glutamina (CAG) del exón 1 del gen HD en el cromosoma 4. El rango normal es de 5-35 codones (15-105 pb) y tener más de 37 codones es patológico. Las expansiones suelen estar en un rango de 40-60 codones, pero nunca superan los 100 codones o los 300 pb. Este tipo de análisis es fácil de realizar por PCR. Los cebadores están diseñados flanqueando la región de interés. Necesitan estar lo suficientemente alejados para que den lugar a un producto que se pueda diferenciar por tamaño en un gel de electroforesis: 100-300 pb es lo ideal. El resultado (*Figura 4.18*) muestra dos bandas porque, por supuesto, la muestra de ADN incluye ADN de las dos copias que Alfred posee del gen HD. Comparando la posición de las bandas de Alfred con la de las muestras control con expansiones conocidas que se encuentran en los carriles adyacentes del gen, se puede comprobar que las dos copias del gen de Alfred tienen 15 y 65 repeticiones res-

pectivamente (*Figura 4.18, Carril 1*). Un tamaño de repetición por encima de 37 es patológico, por lo que este resultado confirma el diagnóstico.

Ahora que el diagnóstico de Alfred es definitivo, significa que John tiene un riesgo del 50% de poder desarrollar la enfermedad de Huntington. Si lo desea, un análisis por PCR de su ADN le confirmará si ha heredado o no la mutación en el gen HD. Tras varias sesiones de consejo genético, John y su mujer pensaron que realizar un análisis genético era mala idea porque podía afectar a su capacidad para conseguir seguros y tal vez a su trabajo.

Tras hablarlo, John se convenció de que sus preocupaciones eran infundadas. Si solicitaba un seguro en el Reino Unido tendría que revelar sus antecedentes familiares de enfermedad de Huntington, y muchas compañías le aumentarían la cuota. De hecho, el análisis genético podía ayudar a John: si era negativo, la historia familiar no contaría, mientras que en Reino Unido, si era positivo no tendría que declarar el resultado para las pólizas de vida hasta cierto grado por moratoria convenida con la industria de los seguros; en cualquier caso, la mayor parte de las malas noticias eran conocidas por la historia familiar. En Estados Unidos, muchos Estados han decretado legislaciones para prevenir la discriminación genética en los seguros. En cuanto al trabajo, en el Reino Unido sería ilegal que un empresario discriminara en base al riesgo genético. A menos que desarrolle síntomas que impidan que realice su trabajo correctamente, su genotipo no será de interés para ningún empresario.

La mujer de John estaba preocupada por la póliza de seguro que ya tenían. Tenía un seguro de vida que pagaría la hipoteca de la casa en caso de fallecimiento. Cuando John se había hecho este seguro no conocía la naturaleza de su problema familiar. De cualquier forma había sido honesto a la hora de contestar a todas las preguntas, por lo que la póliza era válida y no afectaba a acontecimientos posteriores.

Teniendo en cuenta estas preocupaciones, la discusión volvió a la pregunta básica de si John y su mujer querían o no saber. Esta es una decisión muy difícil y personal; el 70% de las personas que se encuentran en la misma posición que John deciden no saberlo. Desde luego un resultado negativo sería una noticia estupenda y un resultado positivo por lo menos permitiría a John y a su mujer comenzar a planear su futuro. Pero muchos de nosotros preferimos ver la vida con un final abierto y solo unos pocos querrán saber, a los 28 años, cuándo y cómo van a morir. Tras una larga reflexión, John y su mujer decidieron no sa-

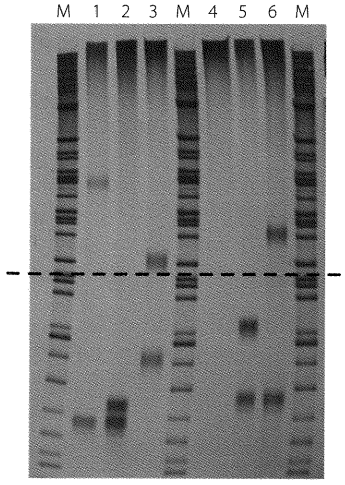


Figura 4.18 – Análisis para la mutación de la enfermedad de Huntington.
Es una aplicación típica de la PCR amplificar una secuencia específica de unos cientos de pb de longitud con cebadores específicos y correr el producto en un gel de electroforesis. Las moléculas más pequeñas se mueven más deprisa en el gel, por lo que la posición de las bandas es una medida del tamaño del producto de la PCR. Las bandas son visibles con marcador de plata. Aunque todo el ADN del genoma está presente, el producto específico de la PCR está presente en muchísimas más copias, por lo que en estas condiciones el ADN genómico de fondo es invisible. Cada muestra tiene dos bandas, que se corresponden con los dos productos de PCR de diferente tamaño que se forma de las dos copias del cromosoma 4. Los carriles marcados con M son marcadores de tamaño para calibrar los tamaños de las bandas. La línea discontinua muestra el límite superior de variaciones normales (36 repeticiones).

berlo. El consejero genético los apoyará tomen la decisión que tomen. Quedará con ellos en los siguientes meses para seguir con su apoyo, y para asegurarles que siempre está disponible para cualquier discusión. También les indica que, si en los próximos años se desarrolla algún tratamiento que pueda frenar el desarrollo temprano de la enfermedad y John esté dispuesto a hacerse al análisis, les promete contactar con ellos.

La discusión final es sobre qué hacer con los otros parientes de John que están en riesgo. Su hermana Helen, los dos hijos jóvenes de ésta y su tía Alice de Australia están en riesgo tras el análisis positivo de Alfred. Quedaron en que John contactaría con ellas, explicaría la situación y daría algunos datos de contacto del servicio de genética local. Era decisión suya establecer contacto o no. Si John hubiera elegido realizarse la prueba, el genetista no habría revelado este hecho o el resultado a otros miembros de la familia. Aunque John y Helen tuvieran una relación estrecha, puede que él eligiera discutir con ella sus pensamientos y decisiones, pero no existía ninguna obligación de hacerlo.

4.4. Resumen y ampliación

La *Tabla 4.1* resume las técnicas utilizadas en este capítulo y el tipo de problema para las que son apropiadas.

Es conveniente clasificar los cambios en el ADN en mutaciones a gran escala y mutaciones puntuales, aunque no existen fronteras rígidas entre las dos. Desde que solo el 1,5% de nuestro ADN codifica proteínas (*Capítulo 3*), la

Tabla 4.1 – Resumen de los métodos descritos hasta ahora, y sus aplicaciones más importantes

Principio	Método	Aplicación
Hibridación	*Dot blotting* con sondas de oligonucleótidos	Comprobar la presencia/ausencia de una secuencia Comprobar un cambio específico de un solo nucleótido
	Southern blotting	Comprobar cambios a gran escala (inversiones, deleciones, etc.) que alteran el patrón de fragmentos de restricción
	FISH en extensiones de cromosomas	Comprobar la presencia/ausencia y localización cromosómica de una secuencia de al menos varias kb de longitud
	FISH en células en metafase	Comprobar el número de copias de cromosomas específicos
	Hibridación genómica comparativa	Buscar en el genoma completo cualquier cambio en el número de copias que implique a secuencias de varias kb de longitud
Amplificación	Clonación de *E. coli*, etc.	Obtener un suplemento continuo de un fragmento de ADN específico, 2-300 kb de longitud dependiendo del vector utilizado
	PCR	Comprobar la presencia/ausencia y tamaño de una secuencia específica de 50 pb-5kb

gran mayoría de cambios al azar de secuencias de ADN no se encontrarán en la secuencia codificante. Normalmente (aunque no siempre) estos cambios no tiene tienen efecto sobre el fenotipo. Considerando los que influyen en el fenotipo y que son interesantes para los genetistas clínicos:

- *Mutaciones a gran escala* incluyen las grandes deleciones y duplicaciones, y las inversiones o traslocaciones cromosómicas que interrumpen físicamente el gen. Debido a que los exones son pequeños en comparación a los intrones, muchos de estos reordenamientos tienen sus puntos de rotura en intrones o entre genes (ver *Figuras 3.9, 4.12* y *4.17*). Las grandes deleciones tienden a ser de uno o más exones completos y las inversiones o traslocaciones normalmente no cambian la secuencia de exones individuales; simplemente los dejan en un lugar equivocado. Los métodos basados en PCR simples no son eficientes para detectar estos cambios. En una traslocación o inversión de un segmento cromosómico cada exón individual parece normal por PCR, mientras que las deleciones, a menos que estén en homocigosis, solo pueden ser detectadas mediante PCR cuantitativa. Lo mejor es el *Southern blot*. Los puntos de rotura producen grandes cambios en el tamaño de los fragmentos de restricción que son fáciles de observar mediante hibridación con la sonda conveniente.
- *Mutaciones puntuales* son cambios en un nucleótido concreto, o cambios que están en un exón o en parte de un exón. Estos cambios generalmente se detectan por PCR. La secuencia que contiene la mutación es amplificada, y el producto de la PCR es secuenciado o analizado mediante otros muchos métodos que serán descritos en este o en el siguiente capítulo.

PCR cuantitativa

Con un cuidadoso protocolo de optimización, la PCR se puede convertir en cuantitativa. Se pueden marcar los cebadores con un fluoróforo y medir la cantidad de producto con un analizador de secuencia fluorescente (ver *Capítulo 5*). Los casos de este capítulo incluyen dos que han sido analizados con la PCR cuantitativa:

- Las mujeres del Caso 4 (Familia Davies, distrofia muscular de Duchenne) pueden ser analizadas para ver si son portadoras de heterocigotos de una deleción en el gen de la distrofina (una alternativa es el MLPA; se discutirá en el *Capítulo 5*).
- La PCR cuantitativa también puede utilizarse en lugar del FISH de interfase para el diagnóstico rápido de trisomías, como se realizó en el Caso 8 (Helen Howard, síndrome de Down). Se utilizan cebadores específicos del cromosoma 21, junto a cebadores de una secuencia de otro cromosoma que sirven como control. Actualmente existe un debate sobre las ventajas de hacer un cribado de alteraciones cromosómicas en mujeres de edad avanzada mediante cariotipo convencional o mediante QF-PCR, el método de PCR cuantitativo utilizando cebadores marcados con fluoróforos para los cromosomas 13, 18, 21, X e Y. La QF-PCR es un método cuantitativo mucho más rápido y barato, pero que no dará

información sobre cualquier variación que no sea el número de copias de uno de los 5 cromosomas estudiados. Es discutible si es beneficioso perder la mayoría de las anomalías de los demás cromosomas. Ver *Capítulo 11* para más información y discusión.

PCR en tiempo real

Muchos kits comerciales (p. ej.: el método Taqman®) utilizan varios trucos muy ingeniosos para marcar solo el producto de la PCR, y no los cebadores o los monómeros. Utilizando una marca fluorescente, se puede seguir la acumulación de producto a tiempo real.

La PCR cuantitativa es más fiable cuando se basa en medir la tasa de acumulación en lugar de la cantidad total de producto al final de un número concreto de ciclos. La PCR en tiempo real se utiliza para cuantificar el número de copias de una secuencia de ADN, o para medir la expresión de un gen por PCR transcriptasa inversa (RT-PCR, ver más adelante). Comparada con la PCR normal, la PCR en tiempo real requiere equipos y reactivos caros.

Análisis del ARN

Northern blotting

En ocasiones es mejor estudiar el ARN que el ADN. Por ejemplo, una pregunta básica sobre un gen es "¿cuándo y dónde (en qué tejido u órgano) se expresa?". Además, la búsqueda de mutaciones en ocasiones resulta más sencilla en el ARNm que en ADN genómico. En parte esto es debido a que el ARNm maduro normalmente es más pequeño que el gen (*Tabla 3.1*). Asimismo, las mutaciones que producen un procesamiento anormal de los exones e intrones suelen ser más obvias en el ARN que a nivel del ADN. De todas formas, el ARN es bastante más difícil de obtener y manejar que el ADN. La muestra tiene que ser obtenida del tejido apropiado; así, el ARN de la distrofina se obtiene biopsiando músculo, y el ARN es inestable, por lo que requiere tomar grandes precauciones en el laboratorio.

Entre las técnicas descritas anteriormente, se puede utilizar una adaptación del *Southern blottting* para identificar de manera directa moléculas de ARNm. Esta variante de la técnica se llama *Northern blotting* (su nombre es una broma: el *Southern blotting* fue desarrollado por de Dr. Ed Southern en Oxford, Gran Bretaña).

Se extrae ARNm del tejido que nos interese, se corre en un gel y se transfiere a nitrocelulosa. La muestra es un ADN marcado correspondiente a los exones del gen a estudiar. El resultado muestra si un ARNm está presente, y si lo está, muestra que tamaño tiene. La ausencia de un tránscrito esperado puede mostrar que un gen puede haber sido silenciado, mientras que un tamaño no esperado puede indicar alteraciones en el procesamiento.

Fabricando ADNc

El ARN no puede ser clonado, amplificado mediante PCR o secuenciado como el ADN. En la mayoría de los estudios de ARN hay que hacer primero una copia en

ADN del ARN y estudiarla. Esto es al contrario del flujo normal de información ADN → ARN, como se describe en el Dogma Central (*Figura 3.3*). Algunos virus codifican una enzima, la transcriptasa inversa, que hace copias de ADN a partir de un molde de ARN. El producto final es un ADNc de doble cadena (ADN complementario). En la *RT-PCR* (reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa), la transcripción inversa se realiza con ARNm total, se utilizan luego unos cebadores específicos del gen y la reacción de PCR en el ADNc total para amplificar el gen elegido. La RT-PCR se puede utilizar como una única operación y es una herramienta poderosa, permitiendo muestrear un tejido para saber dónde se expresa el gen de interés. Las **librerías de ADNc** están hechas con transcritos de ARNm total y clonado, dando lugar a un conjunto de ADNc en masa. Las librerías de ADNc específicas de tejido son un recurso muy importante para identificar genes y su patrón de expresión.

El repertorio completo de ARNm de tipos de células o de tejidos pueden ser estudiados por hibridación con un microarray del total del ARNm (o más generalmente con el cDNA total). Los **arrays de expresión** adaptados llevan anclados oligonucleótidos correspondientes a los exones de toda una serie de genes, incluso de todo el genoma. El cDNA o mRNA se etiqueta con un marcador fluorescente y se hibrida con el array. Por lo general se utiliza un protocolo de hibridación competitiva, tal como se describe para CGH *(Figura 4.7)*. La muestra a estudiar se marca con un marcador de un color y se mezcla con una muestra control marcada con un color diferente. La relación de los dos marcadores vinculados a cada celda del array muestra la relación de expresión de ese gen en el tejido estudiado en comparación con el control. Se muestra un ejemplo en el *Capítulo 12*.

Estudio de proteínas

Si una enfermedad es causada por la ausencia de una proteína concreta, que puede ser el resultado de un gran número de mutaciones en un gen principal, ¿no sería más sencillo estudiar directamente la proteína que analizar la secuencia de todo el gen en busca de una posible mutación? En principio la respuesta debería ser que sí. Sin embargo, mientras que el ADN de cualquier muestra puede ser utilizado para estudiar cualquier gen, la proteína de interés puede estar presente únicamente en un tejido inaccesible. Además, los análisis de ADN son genéricos, mientras que los de proteína son específicos. Esto es, un laboratorio puede aplicar las mismas técnicas para analizar el ADN de cualquier gen, mientras que para cada proteína se requiere desarrollar un ensayo específico y optimizarlo.

Los estudios de proteínas se hacen mejor con kits comerciales, en los que el fabricante ha optimizado los reactivos y el protocolo. Sin embargo, las compañías comerciales solo los desarrollan para enfermedades relativamente comunes. Más adelante, en el *Capítulo 11* habrá ejemplos de análisis de proteínas para búsquedas poblacionales y en el C*apítulo 12,* para el diagnóstico.

Pintado de cromosomas

Esta técnica es una variante del FISH en la que la muestra marcada con fluorescencia es una mezcla de secuencias de un cromosoma particular. En una ex-

tensión de metafases este cromosoma aparece coloreado de manera brillante. Se utiliza para identificar el origen de cromosomas anormales vistos en un cariotipo convencional. Por ejemplo, si utilizamos un pintado del cromosoma 1 en las células de Elizabeth Elliot (Caso 5, *Figura 2.15*), el pintado realzará ambas copias normales del cromosoma 1 más una parte de su cromosoma traslocado que derivaba del cromosoma 1. En este caso particular no se necesita pintado cromosómico para entender el cariotipo, pero los pacientes en ocasiones muestran un pequeño marcador cromosómico "extra", material extra insertado en un cromosoma, cuyo origen es imposible de identificar sin el pintado de cromosomas. Ampliando el concepto, el M-FISH o el SKY usan diferentes mezclas de colores, uno para cada cromosoma, cada uno marcado con una mezcla de diferentes fluoróforos, de tal forma que cada cromosoma se pinta de diferente color. Nos encontraremos con esta técnica cuando estudiemos los cambios cromosómicos complejos típicos de la leucemia y de las células cancerosas (*Capítulo 12*).

Cuadro de enfermedad 4

Enfermedades causadas por la expansión de repeticiones de nucleótidos

El tipo de mutación de la enfermedad de Huntington no es habitual, pero tampoco la única con este tipo de mutación. Comenzando por el síndrome de la X frágil en 1991, han sido identificadas una lista creciente de enfermedades que están causadas por expansión de repeticiones de nucleótidos. La mayoría son repeticiones de trinucleótidos, como en la enfermedad de Huntington, pero se conocen ejemplos que implican la repetición de 4, 5 y 12 nucleótidos. En cada caso las repeticiones están presentes en personas normales, donde son estables y no patológicas. El número de unidades de repetición varía a lo largo de la población normal como resultado de mutaciones raras ocasionales, pero estas están siempre por debajo de un umbral. Si una de estas mutaciones raras crea repeticiones que están por encima del umbral, se volverá inestable y tiene una alta probabilidad de expansión mayor en la transmisión de padres a hijos. A mayor número de repeticiones, mayor inestabilidad. Aparte de esto, las repeticiones por encima de cierto tamaño causan la enfermedad. Las repeticiones que son lo suficientemente grandes para ser inestables, pero que no son capaces de causar la enfermedad, se denominan **premutaciones**. Los portadores de premutaciones están sanos pero tienen alto riesgo de tener niños afectos. Más adelante se muestran los principales ejemplos.

Una característica de muchas de estas enfermedades es la **anticipación**. Este concepto describe la manera en que una enfermedad puede hacerse más grave en las generaciones posteriores. Esto ocurre porque las expansiones de repeticiones son muy inestables y tienden a aumentar durante la transmisión. El tamaño de las expansiones está a menudo correlacionada con la gravedad de los síntomas y/o con el comienzo a edades tempranas. Así, la expansión de repeticiones parece ser la raíz de las enfermedades genéticas que muestran anticipación.

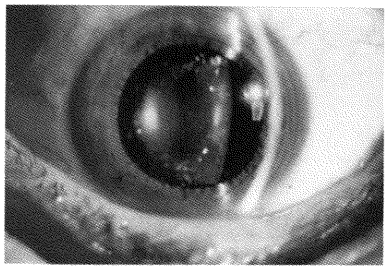
Sin embargo, las publicaciones sobre anticipación hay que verlas con un considerable escepticismo. Si una enfermedad dominante es variable, como lo son muchas, los clínicos verán a menudo niños nacidos afectos con síntomas graves de padres levemente afectados. Con frecuencia se observa a niños levemente afectados que son hijos de padres gravemente afectados. Esto es debido a que las personas afectadas gravemente no suelen tener hijos, y si los tienen, no les parece que haya nada raro en un niño poco afectado. Así, un sesgo habitual en la recogida de datos puede imitar la anticipación.

Enfermedades asociadas a la expansión patogénica de repeticiones de nucleótidos.
SCA, ataxia espino-cerebelar; DRPLA, atrofia dentatorubral palidoluisiana; SBMA, atrofia muscular espinobulbar.

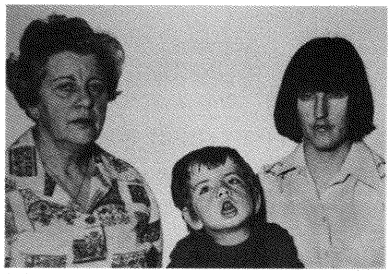
Enfermedad	Nº OMIM	Tipo de herencia	Localización del gen	Localización de las repeticiones	Secuencia repetida	Rango normal (repeticiones)	Rango patológico (repeticiones)
Enfermedad de Huntington	143100	AD	4p16	Exón 1	$(CAG)_n$	5–35	37–120
DRPLA	125370	AD	12p13	Exón 5	$(CAG)_n$	7–34	58–88
SCA1	164400	AD	6p23	Exón 8	$(CAG)_n$	19–38	40–81
SCA2	183090	AD	12q24	Exón 1	$(CAG)_n$	15–29	35–59
SCA3 (Enfermedad de Machado–Joseph)	109150	AD	14q24-q31	Exón 10	$(CAG)_n$	14–40	68–82
SCA6	183086	AD	19p13	Exón 49	$(CAG)_n$	6–17	21–30
SCA7	164500	AD	3p21-p12	Exón 3	$(CAG)_n$	7–17	38–130
SCA17	607136	AD	6q27	Exón 3	$(CAG)_n$	25–44	50–55
SBMA	313200	XLR	Xq11	Exón 1	$(CAG)_n$	11–33	38–62
Sitio A X frágil (FRAXA)	309550	XL	Xq27.3	5'UTR	$(CGG)_n$	6–54	200–>1000
Sitio E X frágil (FRAXE)	309548	XL	Xq28	Promotor	$(CCG)_n$	6–25	>200
Ataxia de Friedreich (FRDA)	229300	AR	9q13-q21.1	Intrón 1	$(GAA)_n$	7–22	200–1700
Distrofia miotónica 1 (DM1)	160900	AD	19q13	3'UTR	$(CTG)_n$	5–35	50–4000
Distrofia miotónica 2 (DM2)	602668	AD	3q21	Intrón 1	$(CCTG)_n$	12	75–11 000
SCA8	603680	AD	13q21	ARN sin transcribir	$(CTG)_n$	16–37	110–>500
SCA10	603516	AD	22q13	Intrón 9	$(ATTCT)_n$	10–22	Up to 22 kb
SCA12	604326	AD	5q31	Promotor	$(CAG)_n$	9–18	66–78
Epilepsia miotónica progresiva (PME)	254800	AR	21q22.3	Promotor	$(CCCCGCCCCGCG)_n$	2–3	40–80

Las nueve primeras enfermedades de la tabla implican expansiones $(CAG)_n$ dentro de la secuencia codificante del gen. El codón CAG da lugar a la glutamina (Ver T*abla 6.1*) por lo que el efecto es una proteína con una cola de poliglutaminas expandidas. Estas proteínas son de alguna manera tóxicas para las neuronas. La muerte acumulativa de las neuronas da lugar

al comienzo tardío de la enfermedad neurodegenerativa. En el *Cuadro de enfermedad 6* se describe con más detalle la SBMA. En la mayoría de las otras enfermedades de la tabla, la expansión de repeticiones impide la expresión de un gen y la enfermedad es el resultado de la falta del producto del gen. Sin embargo, las dos formas de distrofia miotónica son el resultado de la toxicidad del ARNm que contiene la expansión de repeticiones. El ARN tóxico puede también ser parte de la patología molecular de la expansión de repeticiones; el mecanismo por el cual causan enfermedades es diverso y en su mayor parte poco entendido.



(a)



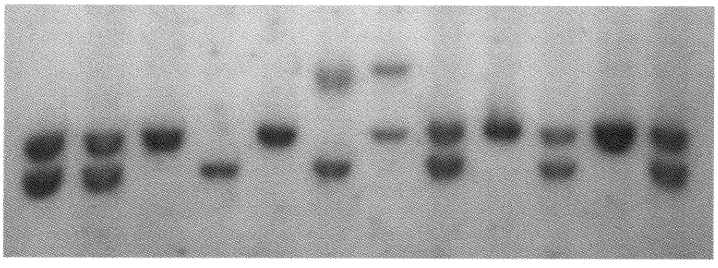
(b)



(c)

Anticipación en la distrofia miotónica.
(a) Una catarata puede ser el único signo de la enfermedad en la primera generación afectada. (b) Tres generaciones familiares muestran a la abuela con cataratas bilaterales pero sin síntomas musculares o debilidad facial; su hija tiene debilidad facial moderada con ptosis y cataratas; el niño tiene la forma congénita. Reproducida con permiso de Myotonic Dystrophy by Peter Harper (Saunders 3rd edition, 2001). (c) Un bebé con la forma congénita que muestra hipotonía. La forma congénita se observa solo cuando el niño hereda la enfermedad de su madre. Está causada por grandes expansiones de repeticiones CTG, que nunca se encuentran en el esperma.

Clínicamente, las enfermedades de poliglutaminas son todas enfermedades neurodegenerativas de aparición tardía. Los síntomas precisos dependen probablemente del patrón de expresión del gen mutado y de aquellos genes cuyos productos interactúan con la proteína mutada. La ataxia de Friedreich es también el resultado de la muerte neuronal progresiva que afecta a la función cerebelar. Las dos enfermedades frágil-X (llamadas así porque cuando se cultivan las células con un medio especial, una región del cromosoma X muestra una zona descondensada, el sitio frágil) cursan con retraso mental de leve a moderado, normalmente con problemas de comportamiento, signos faciales y macroorquidismo. A diferencia de la mayoría de enfermedades ligadas al X, las mujeres portadoras con frecuencia muestran retraso mental de leve a moderado. Finalmente, las dos formas de distrofia miotónica son enfermedades multistémicas con miotonía muscular, cataratas, atrofia testicular y calvicie frontal. La distrofia miotónica muestra una anticipación asombrosa:



Un *southern blot*.
Muestra una expansión inestable de repeticiones CTG en varios miembros de una familia. Las dos bandas inferiores corresponden a un polimorfismo 10/11 kb no patogénico. Las expansiones CTG patológicas dan lugar a bandas más altas. Cortesía del Dr. Simon Ramdens, St Mary's Hospital, Manchester.

4.5. Referencias

En muchos libros de texto se pueden encontrar descripciones de las técnicas descritas, por ejemplo, Strachan T y Read AP (1999) *Genética molecular humana*, Ediciones Omega, S.A., Barcelona disponible en inglés en la NCBI Bookshelf.
http://www..ncbi.nlm.nih.gov/antrez/query-fcgi?.db=Books.

Páginas web útiles

La Universidad de Utah Genetic Science Learning Center tiene una excelente explicación animada de un gel de electroforesis en:
http://gslc.genetics.utah.edu/units/biotech/gel/

El Access Excellence Resource Center tiene una descripción elemental del Southern blotting (http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/southBlotg.html) y otras técnicas. Le faltan detalles, pero es buena por las gráficas.

Para obtener mucha información detallada y dibujos de FISH visite la página web Tavi's Multicolor FISH Page en:
http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/FISH.html

4.6. Ejercicios de autoevaluación

(1) Diseña un cebador de 10 nucleótidos de longitud para amplificar cada una de las secuencias de 50 pb subrayadas de tal manera que dé lugar a un producto de 50 pb.

(a) [Ver Guía de los ejercicios de autoevaluación]

CCACTCCCCTCGGCCAGGGCCGCGTCAACCAGCTCGGCGGTGTTTTTATCAACGGCAGGTACCAGG
AGACTGGCTCCATACGTCCTGGTGCCATCGGCGGCAGCAAGCCCAAGGTGAGCGGGCGGGCCTTGC

(b)

AAGAGAGAACCCGGGCGTGCCGTCAGGTACTAGGCCCATTAACCTCTCCCCGCTTCCTTCCTCCTC
CCGCCCCCAGTGAGTTCCATCAGCCGCATCCTGAGAAGTAAATTCGGGAAAGGTGAAGAGGAGGAG

[Tenga en cuenta que los cebadores reales deben tener 16-25 nucleótidos y estar diseñados para dar un producto de unos cientos de pb; esto es un ejercicio para aprender a coger la posición y orientación de tus cebadores correctamente. Hágalo a mano aunque tenga acceso a un programa de diseño de cebadores.]

(2) La extensión de la *Tabla 4.1* muestra el proceso de la reacción de PCR hasta el ciclo 10. (Necesitará una hoja grande para poder realizarlo). ¿Cuántos ciclos se necesitarán para producir 100.000 copias de producto B?

(3) Hay cuatro nucleótidos diferentes en el ADN, 16 dinucleótidos diferentes, 64 trinucleótidos diferentes y 4^n secuencias diferentes de n nucleótidos de longitud. Si una endonucleasa corta el ADN cada vez que encuentre una secuencia específica de cinco nucleótidos y asumiendo que esto ocurre al azar a lo largo del genoma humano, ¿en cuántos fragmentos debería cortar el ADN de una célula humana?

(4) Teniendo en cuenta que el genoma está constituido enteramente por una secuencia única de ADN, ¿qué longitud debe tener una sonda de oligonucleótidos para ser capaz de hibridar solo en una secuencia del genoma? [Ver Guía de los ejercicios de autoevaluación.]

(5) Para cada uno de los siguientes cambios o efectos de secuencia, elija el posible método de análisis de la lista que está más abajo que pueda servir para comprobar la presencia de un cambio o efecto (en algunos casos puede ser apropiado más de un método):

- Cambio G>A en el exón 2 del gen *PAX3* que da lugar a un cambio de valina 60 por metionina en el producto del gen.
- Deleción heterocigota de 3pb en el exón 6 del gen *BRCA1*.
- Sustitución de nucleótido A>T que cambia el codón de arginina 214 (AGA) a un codón de parada (TGA) en el exón 7 del gen *MITF*.
- Cambio GT>GA en el sitio donador de procesamiento en el final del exón 4 del gen *PAH*, que codifica la enzima hepática fenilalanina hidroxilasa.
- Cambio C>A en un intrón cerca del sitio de procesamiento de la expresión ubicua del gen de la actina: la pregunta es si afectará o no al procesamiento del tránscrito primario.
- Deleción de varios genes contiguos en una copia del cromosoma 17 en un niño con sospecha de síndrome de Smith-Magenis.
- Duplicación de uno o más exones del gen de la distrofina en un niño con distrofia muscular de Duchenne.
- Deleción de uno o más exones en el gen *HYP* en un niño con hipofosfatemia (una enfermedad dominante ligada al X).
- Inserción de tres nucleótidos en el promotor de un gen. La pregunta es si afectará a la expresión del gen.
- Material extra o ausencia de una copia del cromosoma 7 en un paciente. La citogenética dio como resultado que el patrón de bandas de una de las copias de cromosoma 7 era anormal, pero sin poder concretar los acontecimientos exactos que produjeron el cambio.

Opciones:

(a) Amplificación por PCR, comprobar la presencia/ausencia de producto
(b) Amplificación por PCR, medir el tamaño del producto
(c) Amplificación por PCR seguida de secuenciación
(d) Amplificación por PCR seguida por hibridación *dot-blot* con un oligonucleótido específico de alelo
(e) RT-PCR
(f) PCR cuantitativa a tiempo real
(g) *Southern blotting*
(h) FISH
(i) Pintado de cromosoma
(j) Array-CGH

Capítulo **5**

¿Cómo podemos estudiar el ADN en busca de mutaciones?

Conceptos y habilidades que aprenderá en este capítulo

Después de estudiar este capítulo será capaz de:

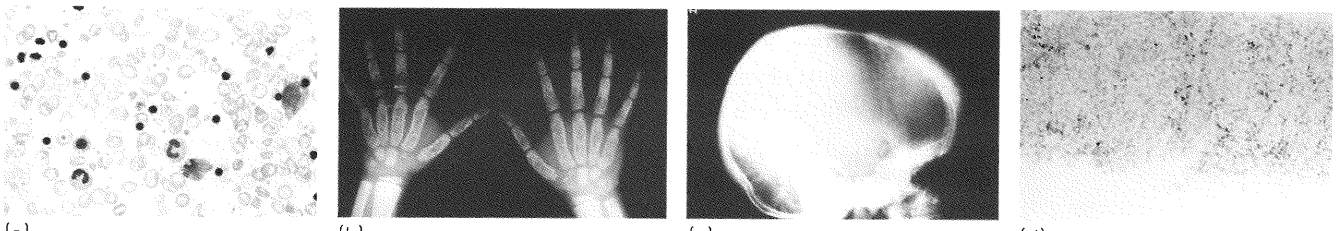
- Conocer el principio de la secuenciación del ADN y ser capaz de leer un fragmento de secuencia en un secuenciador.
- Distinguir los casos en los que el análisis de ADN implica una búsqueda de mutaciones en genes o la comprobación de un cambio específico.
- Conocer de manera resumida los principios de dos métodos (además de la secuenciación) por el que un gen puede ser estudiado en busca de mutaciones.
- Describir de manera resumida los dos métodos por los cuales se puede comprobar en el ADN de una persona una mutación concreta.
- Saber de forma resumida qué dos métodos se utilizan para comprobar en el ADN de una persona si existen deleciones o duplicaciones en exones de un gen.

5.1. Historias clínicas

CASO 14 | Familia Nicolaides | **115** | 129 | 153 | 376

- ? Portadores de β-talasemia

Spiros Nicolaides es un graduado técnico nacido en el Reino Unido cuya familia es originaria de Chipre. Está sano y en un viaje reciente para ver a sus abuelos en Chipre conoció y se enamoró de Elena, que había regresado recientemente de Estados Unidos, donde estudiaba. Ambas familias estaban encantadas y se planeaba una gran fiesta de compromiso. Sin embargo, la hermana mayor de Elena le comentó que antes de casarse debía hacerse algunos análisis sanguíneos para saber si era portadora de la β-talasemia. Afortunadamente, aunque la hermana de Elena era portadora, su futuro marido no lo era y ahora tienen un niño sano. Naturalmente, Elena y Spiros son conscientes del problema y solicitan una cita en la clínica genética para conocer los riesgos.



(a) (b) (c) (d)

Figura 5.1 – Efectos de la talasemia.
(a) Una preparación sanguínea con hipocromía y muchos hematíes nucleados. (b) Apariencia osteosporótica en manos debido a una expansión de la médula. (c) Cráneo *"hair on end"*. (d) Biopsia de hígado con tinción de Perl, mostrando acumulación de hierro. Cortesía del Dr. Andrew Will, Royal Manchester Children's Hospital.

5.2. Antecedentes

En el capítulo anterior se vio cómo la PCR o varios métodos de hibridación se pueden utilizar para examinar cualquier trozo pequeño de una muestra de ADN. A veces no se necesita investigar más. Este era el caso de algunas familias:

- En el Caso 4 (familia Davis), la PCR identificaba y caracterizaba una deleción parcial en el gen de la distrofina, confirmando el diagnóstico de distrofia muscular de Duchenne.
- En el Caso 1 (familia Ashton), el tamaño del producto de PCR identificaba el alelo patológico de la enfermedad de Huntington.
- En el Caso 12 (familia Lawton), el *southern blotting* mostraba que el gen del Factor VIII estaba interrumpido por una inversión, causando hemofilia A.

Pero en muchas enfermedades las mutaciones son sustituciones de un nucleótido por otro en el ADN de un gen que no genera ninguna diferencia visible en la PCR o el *southern blot*. Las inserciones o deleciones de uno o dos nucleótidos tampoco generarán una diferencia apreciable en el tamaño del producto de PCR. Consideremos cómo se pueden comprobar las mutaciones puntuales en un gen.

Los métodos disponibles se dividen en tres clases:

- Secuenciación de ADN
- Métodos que comprueban un cambio específico en la secuencia
- Métodos que de manera rápida analizan el gen en busca de cualquier cambio, sin identificar la naturaleza del cambio

Secuenciación del ADN. El análisis definitivo

Al igual que la PCR, la secuenciación de ADN utiliza un ADN polimerasa para hacer copias del fragmento de interés. Las etapas son las siguientes:

(1) El material de partida es una colección de moléculas de ADN idénticas, producto de PCR o copias clonadas del fragmento de interés.
(2) Para secuenciar queremos solo hacer copias de una de las cadenas de ADN. Por lo tanto, solo se utiliza un cebador (como en la *Figura 4.9*). Además de desnaturalizar el molde de ADN para dejarlo monocatenario, se utiliza un procedimiento de clonación especial. Esto implica el uso de un vector especial, el M13, que aparta las copias solo de una de las dos cadenas.
(3) Cuando tenemos nuestro molde monocatenario, añadimos el cebador, los cuatro monómeros de nucleótidos A, G, C y T, y la enzima ADN polimerasa que sintetizará la cadena complementaria. Pero los monómeros están mezclados con unas moléculas teminadoras de cadena. Esta es la clave de la técnica de secuenciación. La idea fue desarrollada por Fred Sanger y le concedieron el Premio Nobel (¡era el segundo! Había ganado otro por la determinación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas).

Las moléculas terminadoras de secuencia son versiones modificadas de los nucleótidos estándar A, G, C y T (*Figura 5.2*). Se incorporan a la cadena de polinucleótidos creciente de la misma manera que los nucleótidos normales, pero impiden que la cadena siga creciendo. El truco químico que lo permite consiste en quitar

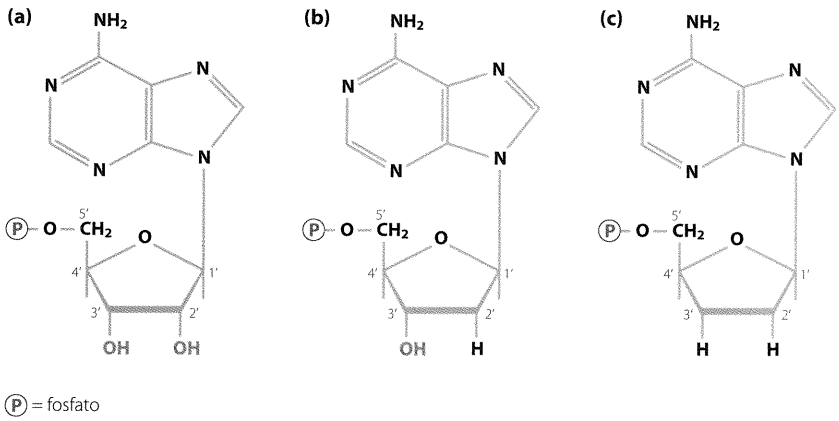


Figura 5.2 – Fórmula (a) del ribonucleótido (b) deoxinucleótido (c) dideoxinucleótido. El dideoxinucleótido se puede unir a la cadena en crecimiento a través de su fosfato 5′, pero al no tener el grupo hidroxil 3′, la cadena no puede seguir creciendo. En las reacciones de secuenciación los dideoxinucleótidos están normalmente marcados, con radioactividad o con un fluoróforo.

el grupo hidroxilo en posición 3 del azúcar deoxirribosa: los terminadores de cadena son *dideoxi* nucleótidos. Debido a que este grupo hidroxilo permite la unión al siguiente nucleótido de la cadena, su ausencia significa que no se puede añadir ningún nucleótido nuevo a esa cadena particular.

Para que todo funcione, solo se necesita añadir la cantidad correcta de terminadores de cadena. Cuando se incorpora una A a la cadena creciente la polimerasa cogerá al azar un nucleótido A normal o la versión dideoxi. Si hay más de un 1% de A-dideoxi que de A normal, entonces en cada posición A alrededor del 1% de las cadenas crecientes incorporarán el terminador de cadena y no crecerá más. Como resultado, se acumulará una serie de fragmentos de distintos tamaños, cada uno de ellos terminado por una dideoxi A. Apliquemos esto a un ejemplo: supongamos que utilizamos un cebador de 20 nucleótidos y el ADN que estamos copiando tiene Ts en las posiciones 7, 10, 15, 21, etc., nucleótidos desde la posición de inicio (el final 3′ del cebador). Por cada T del molde, la polimerasa incorporará una A en la cadena creciente. Una porción de las cadenas crecientes terminará en cada una de estas posiciones. Así que habrá fragmentos de 27, 30, 35, 41, etc., de longitud. Cuando el producto es separado por electroforesis, se puede medir el tamaño de los fragmentos, se puede saber las posiciones de las A de la cadena sintetizada. Si la dideoxi A era el único dideoxi utilizado, no habrá fragmentos de 28, 29, 31, 32, etc., de longitud, porque en estas posiciones la polimerasa no incorpora A en la cadena creciente y no habría riesgo de que un dideoxi A evitara que la cadena creciera más.

La versión original de la técnica de secuenciación de Sanger funciona como se ha descrito, utilizando terminadores de cadena marcados radioactivamente y analizando manualmente (*Cuadro 5.1*). Hoy la mayor parte de la secuenciación se realiza utilizando marcajes fluorescentes de los dideoxinucleótidos (*Figura 5.3*). Esto evita el peligro de trabajar con radioactividad. Se marcan los cuatro dideoxinucleótidos con fluoróforos de distintos colores. Ahora se pueden añadir

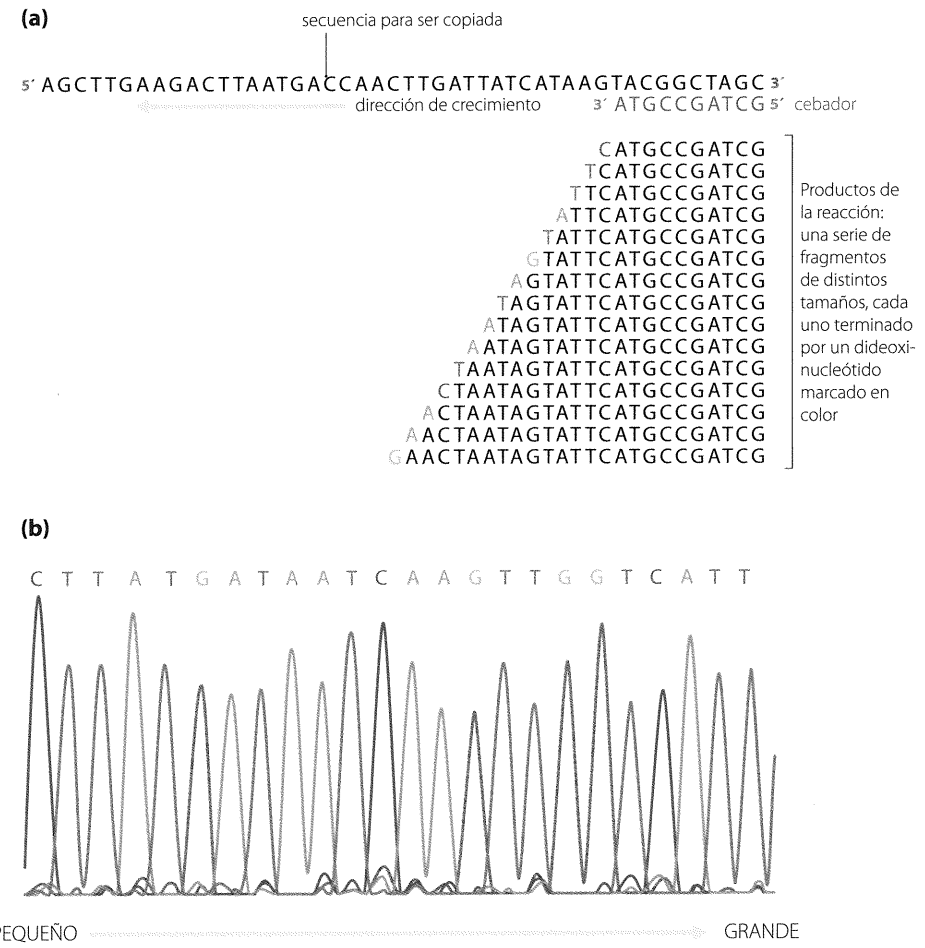
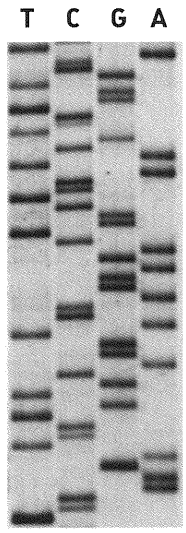


Figura 5.3 – Principios de la secuenciación de ADN. (a) Cada vez que se incorpora un nucleótido en la cadena en crecimiento, existe una pequeña posibilidad de que sea un dideoxinucleótido, que terminará con el crecimiento de la cadena. El resultado es una serie de fragmentos de distintos tamaños. (b) La electroforesis separa los fragmentos por tamaño. Cada dideoxinucleótido está marcado con un fluoróforo. (c) Los secuenciadores como el Applied Biosystem Prism 377 separan de manera automática, detectan, miden y cuantifican los fragmentos.

Cuadro 5.1

Técnica de secuenciación manual original de Sanger

En la versión original de la técnica se utilizaba un marcaje radioactivo de dideoxinucleótidos. Los cuatro nucleótidos estaban marcados igual con S^{32}, por lo que era necesario correr en paralelo cuatro reacciones separadas, cada una de ellas utilizando solo uno de los terminadores de cadena. Se corrían los cuatro productos en carriles adyacentes de un gel de secuenciación, que cuando se cubría con una hoja de película de rayos X revelaba el tamaño de los fragmentos marcados en cada carril de autorradiografía (ver figura). El S^{32} es más utilizado que el P^{32} porque su menor energía de radiación da lugar a bandas más definidas en la autorradiografía.



Secuenciación manual utilizando dideoxinucleótidos marcados radioactivamente. La secuencia se lee desde la autorradiografía, de abajo arriba (porque los fragmentos más pequeños migran más lejos en el gel). Los primeros 15 nucleótidos son TCCAAGATCCTGTGC.

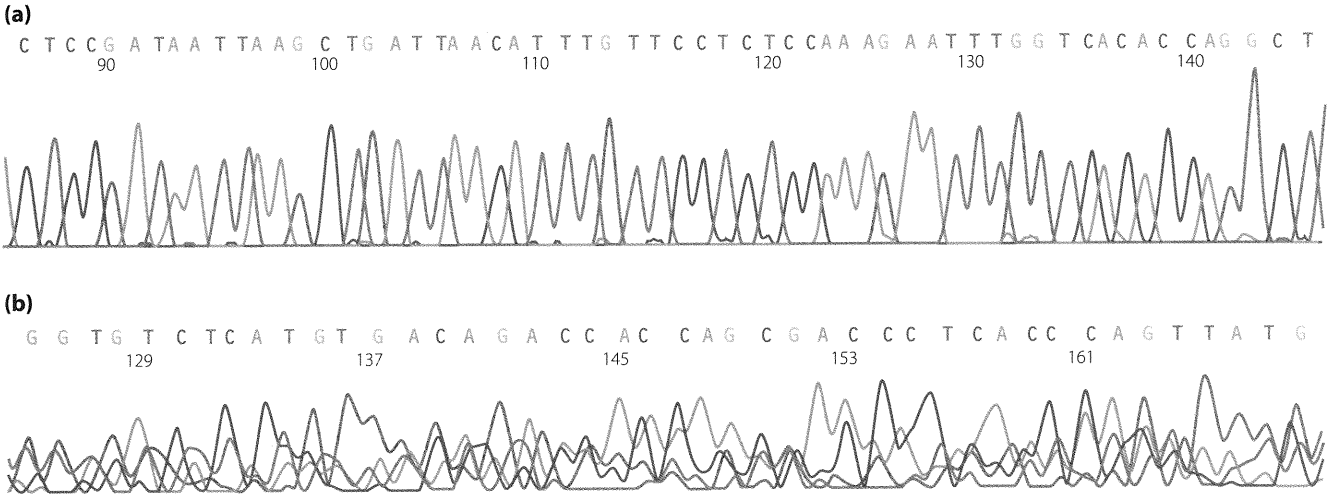


Figura 5.4 – Ejemplo de electroferogramas de secuenciadores de ADN.
(a) Secuencia de parte del exón 15 del gen OCRL. (b) La secuenciación requiere ADN de alta calidad. Si el ADN utilizado no está bien purificado, el resultado puede ser un electroferograma que no puede ser interpretado. (electroferograma (a) cortesía del Dr. Andrew Wallace, University of Manchester; electroferograma (b) anónimo).

pequeñas cantidades de los cuatro terminadores a cada mezcla de reacción. Cada fragmento que termina con una A será (supongamos) verde, con una C azul, y así con los demás. Los secuenciadores de ADN separan los fragmentos por tamaño utilizando un gel o capilar de electroforesis y leyendo el color. El resultado se presenta como series de picos coloreados (*Figura 5.4*). Un software interpreta la secuencia y puede cuantificar cada pico y definir el tamaño de cada fragmento. Estas características hacen de los secuenciadores automáticos herramientas muy útiles. Cada vez más, los tests basados en PCR están formulados para utilizar cebadores marcados con fluoróforos, de tal manera que el producto de la PCR

puede ser medido y cuantificado en el secuenciador, en lugar de ser corridos en un gel de electroforesis. Un gran número de test ilustrados más abajo con fotografías de geles son hoy en día analizados habitualmente en un secuenciador.

Métodos para detectar cambios específicos en secuencias

Con frecuencia ocurre que en el laboratorio se busca la presencia o ausencia de una variante específica de una muestra. Esto sucede bajo varias circunstancias.

- Que la enfermedad siempre esté causada por el mismo cambio en la secuencia. El análisis prenatal para la anemia falciforme en la familia Kavanagh (Caso 1) se basa en que la anemia falciforme siempre está causada por el mismo cambio preciso de secuencia. Las razones por las que algunas enfermedades están siempre causadas por una misma mutación se verán en el *Capítulo 10.*
- Una enfermedad puede ser causada por varias mutaciones distintas, pero una o algunas mutaciones pueden ser tan frecuentes en una población, que es mejor comprobarlas antes de realizar un análisis más general. Un ejemplo es la fibrosis quística. Existen más de 1000 mutaciones descritas, pero el 80% de todas las mutaciones en el norte de Europa es una deleción particular de tres nucleótidos (ver *Tabla 11.1*); el 80% de todas las mutaciones de la β-talasemia en los griegos chipriotas es la c.93-21G>A (ver *Tabla 5.2*)
- El análisis puede consistir en analizar a un pariente con una mutación familiar que ha sido ya identificada y caracterizada en otros familiares.

Las mismas técnicas se utilizan también para genotipar personas para los polimorfismos no patogénicos de un solo nucleótido (SNPs), por ejemplo, en el análisis de ligamiento y asociación (*Capítulo 9*) y en investigaciones antropológicas.

Hay muchos métodos para detectar un cambio específico en una secuencia.

- Secuenciar el ADN, normalmente como producto de PCR. Correr una secuenciación estándar de Sanger como se ha descrito dará lugar a una secuencia de cientos de nucleótidos, que no es lo que necesitamos en este caso. Una variante especial de este método, Pyrosequencing®, secuencia solo unos pocos nucleótidos desde un punto de inicio. La pirosecuenciación requiere un aparato y reactivos especiales pero, una vez que está funcionando, es un buen método para comprobar el cambio de un nucleótido determinado en una gran muestra de individuos. En la *Figura 5.16* se muestra un ejemplo.
- Hibridar una muestra amplificada por PCR con una sonda de oligonucleótidos específica de un alelo (*Capítulo 4, Figura 4.11*).
- Digerir con una enzima de restricción. Si la mutación ocurre puede crear o destruir una secuencia que es un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, esto permite un análisis sencillo. La región es amplificada por PCR, el producto se digiere que una enzima de restricción y luego se corre en un gel. El tamaño de los fragmentos muestra si el sitio de restricción está presente. Los heterocigotos muestran los fragmentos cortados y los no cortados. Se ilustra para LHON (Caso 6, familia Fletcher, *Figura 5.15*) y para la β-talasemia (Caso 14, familia Nicolaides, *Figura 5.14*).

- Desarrollar una reacción de PCR específica de alelo. Los cebadores de la PCR pueden trabajar incluso cuando existen pequeños desapareamientos (*mismatches*) en la diana, con tal de que el cebador sea lo suficientemente largo para hibridar, pero el nucleótido del extremo 3′ del cebador es crítico. A menos que se formen las parejas correctas con el molde, la reacción no funcionará. Podemos comprobar si un nucleótido dado es una A o una G creando una reacción de PCR donde este nucleótido debe aparearse con el nucleótido del extremo 3′ de uno de los cebadores. El extremo de un cebador terminado en T solo amplificará con el alelo A, y el C es A solo con el G. Como en la ASOs, dos reacciones paralelas correrán con dos cebadores diferentes, o se marcan alternativamente de diferente forma los cebadores, de tal manera que dan lugar a un producto identificable en cada mezcla de reacción. La *Figura 5.5* muestra el principio; las *Figuras 5.10* y *5.13* muestran sus aplicaciones.
- Análisis de ligamiento de oligonucleótidos (OLA). La enzima ADN ligasa se vio en el *Cuadro 4.5*. Esta enzima fija covalentemente una unión de una cadena sencilla en la doble hélice de ADN. Para analizar un cambio A/G por OLA, se hibridan dos oligonucleótidos al ADN problema. Uno tiene su extremo 3′ en una posición variable, el otro el 5′ en el siguiente nucleótido. La ADN ligasa unirá los dos si están encajados en la cadena problema, pero no lo hará si alguno de los dos nucleótidos de los extremos que debería estar unido no está emparejado con el ADN problema. Los oligonucleótidos se aíslan y se comprueba el tamaño para ver si el producto de la ligación está presente. La OLA ha sido desarrollada como un kit adaptado para comprobar si se han producido un abanico de cambios específicos de secuencia. La *Figura 5.6* muestra el principio.

El método depende de cuántas muestras haya que analizar. Los oligonucleótidos específicos de alelo y los del OLA tienen que ser sintetizados a la carta. Esto hace que estos métodos sean poco atractivos. Los cebadores para la PCR específica de alelo tienen que ser a su vez sintetizados a la carta, pero esto es solo un gasto extra porque cualquiera que sea la técnica utilizada, los cebadores para la amplificación de la PCR serán necesarios. La digestión con enzimas de restricción



Figura 5.5 – Principio de la reacción de PCR específica de alelo.
La reacción de PCR no dará lugar a un producto si el nucleótido que está en el extremo 3′ no se empareja correctamente. Se tolera que no encaje una base en otras partes del cebador, pero en el extremo 3′ deben encajar. Uno de los cebadores (a la izquierda aunque no se muestra) es estándar; el segundo cebador es específico para uno de los alelos de un polimorfismo simple T/A (verde). Se realizan dos reacciones, una utilizando los cebadores comunes T-específicos, la otra utilizando los cebadores A-específicos. Para ejemplos ver *Figuras 5.10* y *5.13*.



Figura 5.6 – Utilización del ensayo de ligamiento con oligonucleótidos para genotipar una variación C/T.
La ADN ligasa puede sellar uniones solo entre dos oligonucleótidos lindantes, si los dos extremos están correctamente emparejados con la cadena molde. Un oligonucleótido está marcado con un fluoróforo y tras la reacción de ligamiento el tamaño del producto marcado se mide en un secuenciador de ADN. Los análisis OLA pueden ser multiplex diseñando oligonucleótidos para dar distintos tamaños de producto de ligamiento, y/o mediante marcaje con diferentes fluoróforos.

es simple, pero si la secuencia concreta cambia requerirá el uso de enzimas poco comunes y esto puede ser caro. Además, no todos los cambios crean o eliminan un sitio de restricción. La pirosecuenciación es un buen método general para analizar muchas muestras, pero el equipamiento es caro.

Métodos de búsqueda de cambios de secuencia de un gen

La tarea más común de diagnóstico de ADN en un laboratorio es la de comprobar la secuencia completa de un gen en busca de mutaciones. Cada vez más, el laboratorio solo secuencia cada exón y sitio de procesamiento de un gen. La secuenciación es el mejor método para buscar mutaciones, pero aunque cada vez es más barato, sigue siendo una técnica cara. Se necesitan habilidad y ADN de buena calidad para obtener resultados lo bastante claros que permitan detectar de manera segura a los heterocigotos. La estructura de los genes hace que la búsqueda por secuenciación sea relativamente ineficiente. Los exones humanos individuales tienen una media de 145 pb, muy por debajo de los 400-800 pb que pueden ser leídos en una reacción de secuenciación, pero muchos intrones son demasiado largos para permitir que se puedan amplificar más de un exón del ADN genómico en cada reacción de PCR. Así, analizar un gen implica una reacción de PCR y una secuenciación para cada exón. Para un gen como la fibrillina (ver Caso 10, familia Johnson) con 66 exones, implicaría un gran trabajo. Estudiar el ARNm por RT-PCR puede solventar el problema (ver *Capítulo 4*), pero el ARN es difícil de manejar, y obtenerlo puede resultar excesivamente invasivo.

Por estas razones, se utilizan otros métodos. Esto permite una búsqueda rápida de un fragmento de ADN como un exón amplificado por PCR y ver si la secuencia difiere de una versión normal. Utilizando esto se ahorra tiempo y dinero. Los métodos más comunes están basados en dos principios:

- *Propiedades de los heterodúplex.* Si un individuo es heterocigoto para una variante de secuencia en un exón, la amplificación por PCR del exón dará una mezcla de secuencias mutada y normal. Si se calienta la mezcla de ADN hasta desnaturalizarla y luego se enfría lentamente, algunas de las dobles hélices resultantes serán **heterodúplex,** conteniendo una cadena de

cada uno de los dos alelos. Los heterodúplex tienen burbujas o torceduras en comparación con el ADN bien emparejado (*Figura 5.7a*). Esto hace que corran más despacio a lo largo de un gel de electroforesis que los homodúplex correspondientes. Su presencia puede ser detectada en forma de bandas extra en el gel. Además, los heterodúplex se desnaturalizan con más

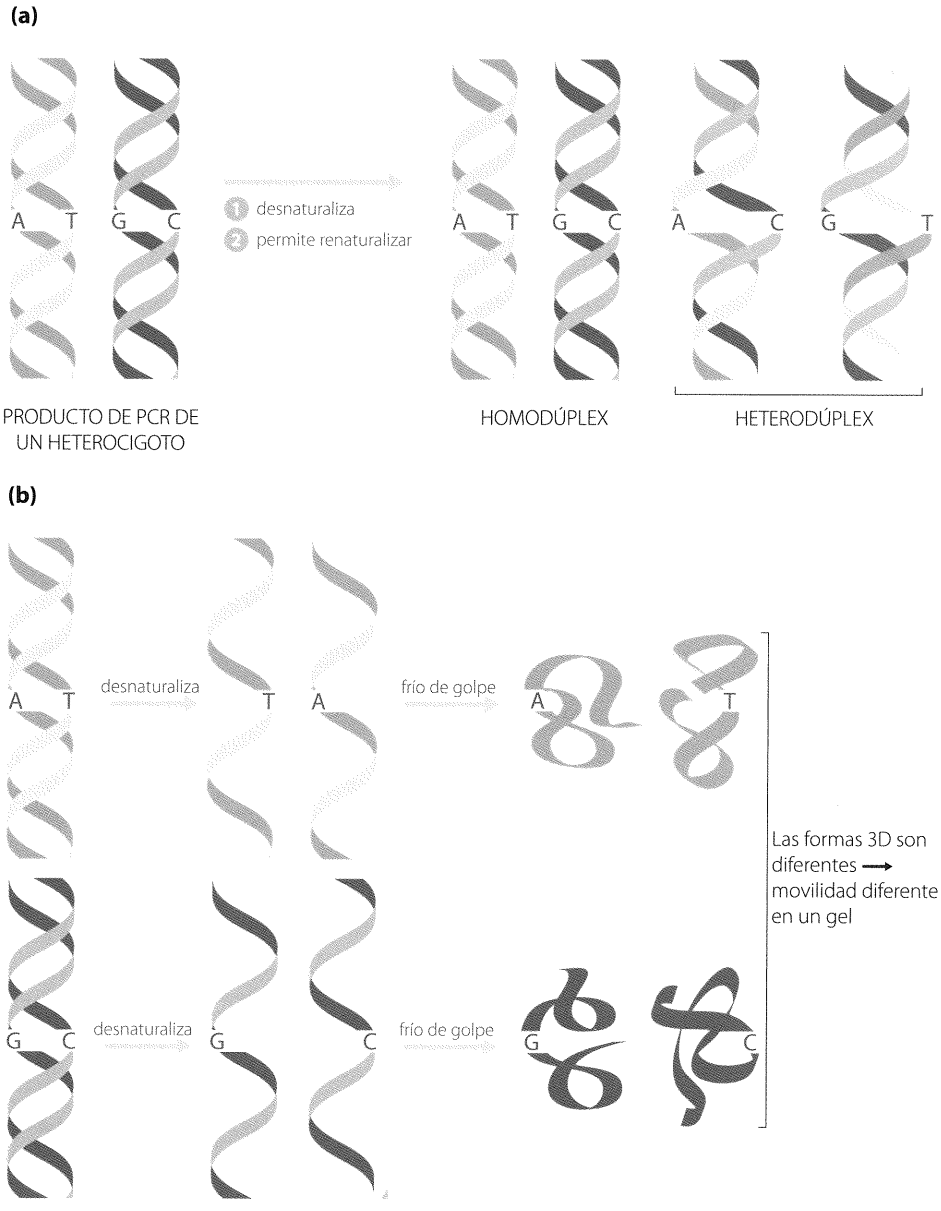


Figura 5.7 – Dos técnicas para la búsqueda de mutaciones.
(a) Los heterodúplex se forman cuando el producto de PCR de un individuo heterocigoto se calienta y luego se le permite renaturalizar. Los heterodúplex se pueden detectar por su capacidad disminuida de migración en un gel de electroforesis, o por su menor temperatura de desnaturalización en una columna de cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento. (b) El ADN de cadena simple adopta una conformación que depende de su secuencia. Las muestras de individuos con diferentes variantes de secuencia se comportan de manera distinta, aunque impredecible, y muestran diferente movilidad en un gel. En la *Figura 5.11* aparece un ejemplo real.

facilidad que los dúplex por completo emparejados. Esto se puede apreciar, por ejemplo, por su movilidad alterada en una columna de cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (dHPLC). Se utiliza mucho el dHPLC para estudiar la misma secuencia en muchas muestras.

- *Propiedades del ADN de cadena simple.* El ADN de cadena simple se ata a sí mismo mediante nudos como bases en diferentes partes del par de filamentos. La forma precisa de cada nudo depende de la secuencia, y afecta a la forma en que el nudo migra en un gel de electroforesis. El análisis de Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) busca cualquier diferencia entre la migración de la muestra problema y una secuencia normal (*Figuras 5.7b* y *5.11*). Comparado con el dHPLC, el SSCP no requiere un equipo caro y es fácil de poner en marcha, pero probablemente pierde más mutaciones (su sensibilidad es de un 80-90%).

Los laboratorios a menudo utilizan estos o parecidos métodos para realizar una búsqueda preliminar en cada exón de un gen. Cualquier exón que muestre una diferencia con la versión normal se secuencia. Comparado con la simple secuenciación de cada exón, estos dos pasos de aproximación disminuyen el coste y el trabajo. De todas formas, ninguno de estos métodos es capaz de recoger el 100% de los cambios de secuencia.

Métodos para detectar deleciones o duplicaciones en exones completos

Como se vió en el *Capítulo 3* (*Figura 3.9*), las grandes deleciones o duplicaciones de un ADN genómico causan deleción o duplicación de exones completos. Los exones forman solo una pequeña parte de toda la secuencia del genoma humano, por lo que es difícil que un punto de rotura al azar caiga en un exón. Incluso si el punto de rotura está en un gen, es más probable que esté dentro de un intrón. En un individuo heterocigoto, una deleción o duplicación de uno o más exones puede no ser detectada con los métodos descritos. Por ejemplo, Judith Davies (Caso 4) es heterocigota para una deleción de varios exones del gen de la distrofina. Pero si amplificamos por PCR cada exón del gen de la distrofina de manera individual, se amplificará la secuencia apropiada de su cromosoma X normal, y el producto de PCR aparecerá normal con cualquiera de los métodos descritos. Se necesitan técnicas especiales para detectar las deleciones o duplicaciones de exones completos.

- La PCR cuantitativa fue descrita en el *Capítulo 4*. Cuando las principales decisiones de una persona dependen del resultado de un análisis, como en el caso del riego de las mujeres de la familia Davies (Caso 4), es esencial un análisis exacto y fiable. Normalmente se utilizan varios sistemas comerciales que se basan en la PCR en tiempo real y la PCR cuantitativa.
- *La amplificación multiplex dependiente de ligación* (*MLPA*) utiliza la especificidad de la OLA (*Figura 5.6*) para incrementar la exactitud de una PCR cuantitativa. La *Figura 5.8* muestra el principio de la técnica y la *Figura 5.9* muestra un ejemplo. El MLPA ha ganado rápidamente la aceptación de los laboratorios de genética debido a su simplicidad comparada con otros métodos, a su relativo bajo coste, a su alta capacidad de rendimiento del

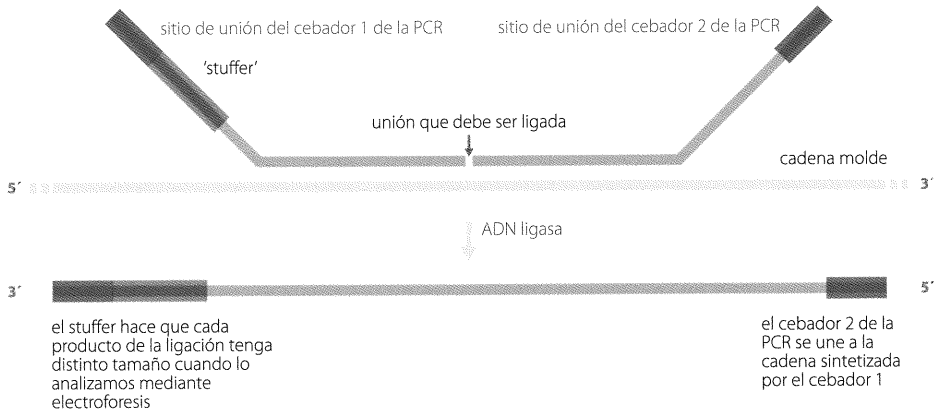


Figura 5.8 – Principios del método para detectar deleciones o duplicaciones. Amplificación multiplex dependiente de ligación (MLPA).
Cada sonda consiste en un par de oligonucleótidos que se pueden ligar si su secuencia diana está presente en la muestra a estudio, como en un ensayo de ligación de oligonucleótidos (*Figura 5.6*). Tras la ligación la mezcla de sondas se amplifican por PCR utilizando un simple par de cebadores que hibridan con las secuencias presentes en los extremos de cada pareja de sondas. Solo las moléculas ligadas pueden ser amplificadas porque poseen ambos sitios de unión a los cebadores. Uno de los cebadores está marcado con un fluoróforo, y la mezcla de reacción se analiza en un secuenciador de ADN. Cada sonda tiene un producto de amplificación de diferente tamaño, dando un único pico en el gráfico de secuenciación.

proceso y a la robustez mostrada. El MLPA es un procedimiento multiplex, analizando más de 45 secuencias cortas (normalmente de 60 pb) de manera simultánea para variaciones de número de copia. Esto hace que esté bien adaptada para analizar un gen multiexónico de gran tamaño en busca de cualquier deleción exónica, pero de la misma forma puede ser utilizada para analizar exones seleccionadas de varios genes diferentes. Establecer un nuevo ensayo por MLPA requiere tiempo porque cada muestra necesita ser diseñada con cuidado, por lo que frecuentemente se utiliza para estudiar genes para los que están disponibles kits comerciales. Las sondas de MLPA son caras porque son mucho más largas que los cebadores de las PCRs normales, pero en conjunto la técnica es más barata que otras alternativas.

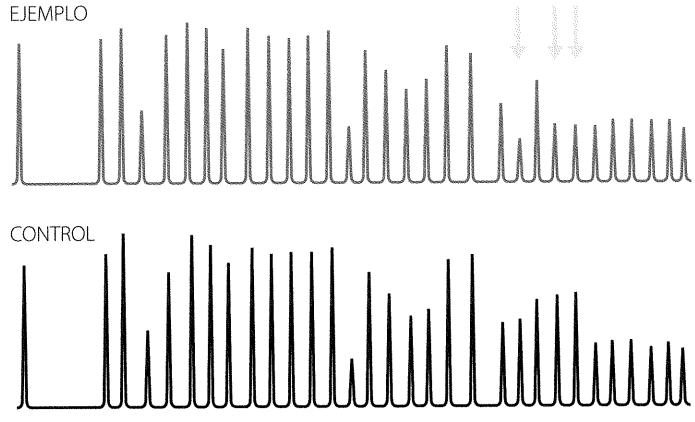


Figura 5.9 – Un ejemplo de MLPA.
Cada pico es un producto de ligación amplificado de un exón de un gen. El gráfico superior muestra una reducción en el número de copias de tres picos, correspondientes a tres parejas de sondas. Reproducido con permiso de MRC-Holland.

5.3. Estudio de pacientes

Las historias hasta ahora...

La *Tabla 5.1* resume los logros y requisitos para analizar en los casos descritos hasta ahora. Esta sección describe las pruebas posteriores realizadas en los casos 2, 6 y 14, que ilustran varias de las técnicas explicadas.

Tabla 5.1 – Resumen de las pruebas realizadas en los casos en estudio y las adicionales que requieren algunos de ellos

Caso	Problema	Pruebas hasta ahora	Pruebas que necesitan
1	Enf. de Huntington	Tamaño de la expansión por PCR	No se necesita
2	Fibrosis quística		**Buscar mutaciones el gen *CFTR***
3	Sordera		Identificar el gen y la mutación (ver *Capítulo 9*)
4	Distrofia muscular de Duchenne	Deleción de los exones 44–48 definida por PCR	No se necesita
5	Traslocación cromosómica	Identificada por cariotipo	No se necesita
6	Neuropatía óptica de Leber		**Buscar mutación mitocondrial**
7	? Deleción 22q11	Deleción confirmada por FISH	No se necesita
8	Síndrome de Down	Confirmado por cariotipo. Análisis prenatal por FISH	No se necesita
9	Síndrome de Turner	Confirmado por cariotipo. Búsqueda de secuencias Y por PCR	No se necesita
10	Síndrome de Marfan		No se realiza análisis
11	Anemia falciforme	Análisis prenatal con oligonucleótidos específicos de alelo	No se necesita
12	Hemofilia	Inversión con *Southern blot*	No se necesita
13	? Anomalía cromosómica	Búsqueda de alteraciones cromosómicas no balaceadas con array CGH; analizar si es de novo	No se necesita
14	β-talasemia		**Identificar la mutación**

CASO 2 | Familia Brown | 2 | 8 | 65 | **126** | 151 | 279 | 376

- Niña de 6 meses de edad, padres David y Pauline
- ? Fibrosis quística
- ¿Petición de análisis molecular?
- Definir mutaciones del gen *CFTR*

David y Pauline indicaron que estaban considerando tener más hijos en el futuro, pero que desearían tener un análisis prenatal definitivo para descartar la fibrosis quística en el nuevo hijo. Antes de poder efectuarlo era necesario definir las dos mutaciones de Joanne. Además, otros miembros de esta gran familia fueron conscientes de su riesgo de ser portadores y expresaron su deseo de hacerse un análisis de portadores. Una vez más, este tenía que ser realizado comprobando si tenían la mutación de Joanne. Aunque han sido descritas más

de 1000 mutaciones diferentes en el gen *CFTR* en pacientes de fibrosis quística, la mayor parte de estas habían sido vistas solo en uno o muy pocos casos. Un pequeño número de mutaciones son relativamente frecuentes. La búsqueda de mutaciones para la fibrosis quística comenzaba con la búsqueda de estas mutaciones frecuentes. Se encuentran disponibles varios kits comerciales que sirven a este propósito. Se analizó el ADN de Joanne con un ensayo de PCR específico de alelo (ver el principio de la técnica en la *Figura 5.5*). El resultado (*Figura 5.10*) muestra que tiene la mutación p.F508del (ver explicación resumida de la nomenclatura en el *Cuadro 5.2*, aunque esta se denomina con frecuencia por el nombre no estándar delta-F508). Esta mutación es la de fibrosis quística más frecuente en el norte de Europa, con un 70-80% de todas las mutaciones de la fibrosis quística en muchas poblaciones.

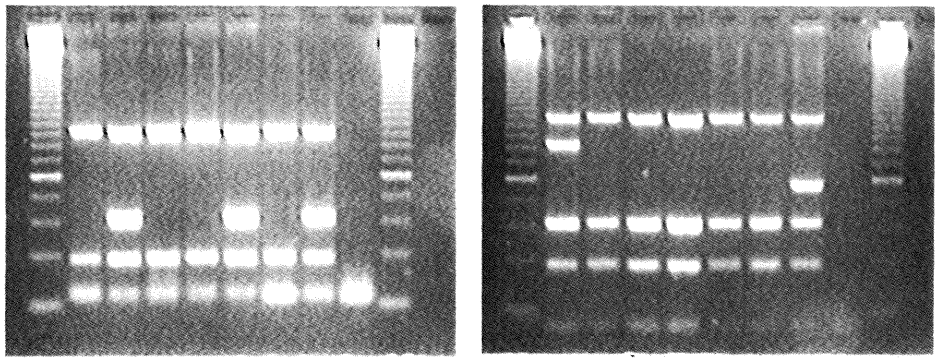


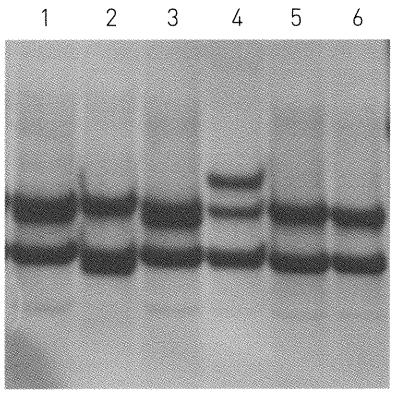
Figura 5.10 – Un test de PCR multiplex específico de alelo para las mutaciones más comunes del CFTR.
En los dos geles las mismas siete muestras son amplificadas con diferentes cócteles de cebadores. No se detectan mutaciones en los carriles 3 y 4. Las bandas extra del resto de carriles definen una mutación particular por su presencia y tamaño. Cortesía de Victoria Stinton y Roger Mountford, Liverpool Women's Hospital.

Joanne es heterocigota para la mutación p.F508del porque el análisis muestra que tiene también el correspondiente alelo normal. No fue detectada una segunda mutación. Dado su diagnóstico debía tener una segunda mutación, pero esta podía estar en cualquier lugar a lo largo del gen. En lugar de secuenciar de forma inmediata los 27 exones del gen *CFTR*, el laboratorio amplificó por PCR cada exón y utilizó el método SSCP (ver *Figura 5.7b*) para identificar los exones que tuvieran alguna variación. El resultado (*Figura 5.11*) muestra que había algo diferente en los exones 3 y 14b del ADN de Joanne. Una o ambas de estas variaciones no tenían por qué ser variantes patológicas de secuencia. (Por razones históricas los 27 exones del gen están numerados en la principal base de datos como 1-5, 6a, 6b, 7-13, 14a, 14b, 15, 16, 17a, 17b, 18-24.)

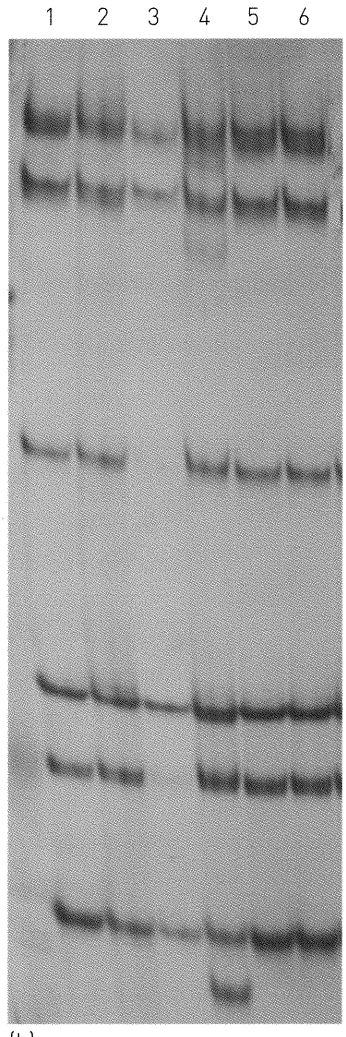
La *Figura 5.12* muestra una de esas secuencias, comparándola con un control. Se identificaron los siguientes cambios:

- exón 3 c.368G>A
- exón 14b c.2752–15C>G

En el *Capítulo 6* veremos cómo procura decidir el laboratorio cuál de estos cambios puede ser patológico.



(a)



(b)

Figura 5.11 – Análisis por SSCP de los exones del gen *CFTR*.
Cada exón fue amplificado por separado en reacciones de PCR de cada una de las series de muestras de los pacientes de fibrosis quística. Se muestran los resultados del exón 3 (a) y 14b (b). En la muestra de Joanne los productos (carriles 4 de cada gel) señalan un patrón de bandas diferente en relación a las otras muestras, indicando que tienen alguna diferencia en su secuencia. Las muestras de los carriles 2 y 3 (de otros pacientes de fibrosis quística) también presentan anomalías en el exón 3. Se necesita secuenciar (*Figura 5.12*) para poder identificar el cambio y decidir si es patológico. Con este procedimiento se reduce la necesidad de secuenciar la muestra de Joanne de 27 a 2 exones.

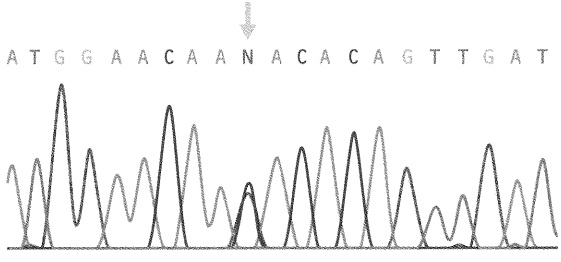


Figura 5.12 – Gráfico de secuenciación de ADN de parte del exón 14b del producto de PCR del gen *CFTR* de Joanne Brown.
En la posición donde está la flecha se encuentran los nucleótidos G y C, mostrando que Joanne es heterocigota para una sustitución de nucleótido (los productos de la PCR y de la secuenciación suelen ser una mezcla de los productos de ambos alelos). Las muestras control solo tienen una G. Es habitual que se secuencien por separado ambas cadenas del ADN para confirmar cambios. Aquí la secuencia muestra solo la cadena antisentido, por lo que en la cadena sentido el cambio de Joanne sería C>G.

Cuadro 5.2

Pequeña guía sobre la nomenclatura de las mutaciones

Una mutación se puede describir en términos del cambio en el ADN genómico, del ADNc o de la proteína que codifica. La descripción va precedida de g., c. o p. según a cuál se refiera.

Para el ADN, > significa "cambio a". Así, G>A significa que el nucleótido G normal ha sido reemplazado por una A. Las deleciones o inserciones están simbolizadas por *del* e *ins* respectivamente. El nucleótido modificado se numera desde el punto de partida, utilizando un archivo de una base de datos aceptada. En el caso del ADNc, se cuentan los nucleótidos desde la A del codón de inicio AUG. A un nucleótido en un intrón se le da el número del último nucleótido del exón que lo precede, un signo de suma y la posición en el intrón, como en c.77+1, c.77+32, etc. Si está cerca del final de un gran intrón se le puede dar el número del primer nucleótido del siguiente exón, un signo de resta y la posición (en las *Tablas 5.2* y *11.1* aparecen ejemplos). En el caso del ADN genómico, la posición del nucleótido de inicio debe ser especificada.

A nivel de proteínas se utilizan la abreviaturas de una letra o tres letras de aminoácidos (ver *Cuadro 3.6*). La X significa un codón de parada. Se cuentan los aminoácidos desde la metionina iniciadora de la proteína (incluso cuando esta es eliminada en el proceso posterior a la traducción).

Ejemplos:

c.76A>C significa que en el nucleótido 76 una A cambia a C.
c.76-78del significa que hay una deleción de tres nucleótidos, desde el nucleótido 76 al 78 (este último incluido).
p.Ala26Val o p.A26V significa que el aminoácido alanina-26 cambia a valina.
p.Cys318X o C318X significa que el codón cisteína 318 cambia a un codón de parada.
Este nivel de detalle es suficiente para entender el contenido de este libro. La nomenclatura ha sido desarrollada para poder definir cualquier posible variación en la secuencia. Puede encontrarse información detallada en la página web de la Human Genome Variation Society.
http://www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/mutnomen/

CASO 14 — Familia Nicolaides — 115 — **129** — 153 — 376

- ? Portadores de β-talasemia
- Búsqueda de mutaciones

Las hemoglobinopatías son las enfermedades genéticas estudiadas más a fondo, quizá porque afectan a millones de personas. Los niños homocigotos para la β-talasemia tienen una vida muy difícil. Requieren transfusiones continuas, pero el mayor de sus problemas es la acumulación de hierro. En la población grecochipriota se ha estimado que una de cada siete personas es portadora de la β-talasemia. Así es de esperar que de cada 49 matrimonios uno sea entre portadores. Esto ha hecho que se cree un programa nacional de cribado. Las razones de por qué las hemoglobinopatías son tan frecuentes en algunas poblaciones se explicará en el *Capítulo 10*. Los análisis de portadores se llevan a acabo con análisis hematológicos de rutina. Estos mostraron que tanto Spiro como Elena eran portadores; sin embargo, eran totalmente sanos. Se les ofreció un análisis molecular para identificar la mutación precisa y decidieron hacerse la prueba, ya que pensaron que necesitarían hacerse un diagnóstico prenatal durante los embarazos. Era mejor hacerlo ahora, que cuando Elena estuviera embarazada.

Tanto Spiro como Elena dieron una muestra de mucosa bucal de la que se extrajo ADN. En la población grecochipriota cinco mutaciones específicas en el gen de la β-globina dan cuenta del 98,4% de todas las mutaciones causantes

de la β-talasemia (*Tabla 5.2*). Su ADN fue analizado primero en busca de estas mutaciones, si sus resultados fueran negativos, sus genes de β-globina serían secuenciados en busca de cualquier posible mutación. Debido a que el gen de la β-globina es pequeño (3 exones y 2 intrones; solo unas 1.500 pb en total), se puede secuenciar en busca de mutaciones de manera rutinaria todos los exones, intrones y la secuencia del promotor.

Tabla 5.2 – Mutaciones comunes para la β-talasemia en grecochipriotas

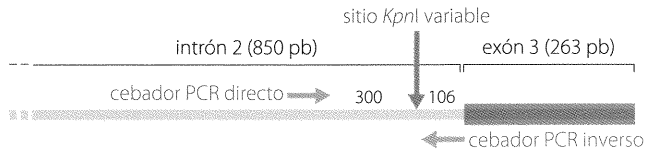
Mutación	Porcentaje de todas las mutaciones para β-talasemia en población grecochipriota	En al secuencia: (normal, mutante)
c.93–21G>A	79,8	ctattggt ctattttccc ctattagt ctattttccc
c.92+6T>C	5,5	AGgttggtat AGgttggcat
c.92+1G>A	5,1	AGgttggtat AGattggtat
c.316–106C>G	5,1	cagctaccat caggtaccat
p.Gln39X	2,9	TGGACCCAGAGGTTC TGGACCTAGAGGTTC

Las secuencias de los exones están en mayúsculas y las de los intrones, en minúsculas. Todas las mutaciones, menos la última, son mutaciones en intrones del gen de β-globina. Ver *Cuadro 5.1* para la nomenclatura de las mutaciones y *Capítulo 6* para saber cómo pueden causar la enfermedad estos mutantes. Datos de la base de datos HbVar (http://globin.cse.psu.edu/globin/hbvar).

Ninguno de ellos era portador de la mutación más frecuente en Chipre, la c.93-21G>A, por lo que su ADN fue analizado en busca de las otras cuatro mutaciones. Spiro resultó ser portador de la mutación p.Gln39X, mientras que Elena era portadora de la mutación c.316-106C>G. Todas estas mutaciones pueden ser comprobadas con secuenciación, PCR específica de alelo o hibridación con oligonucleótidos específicos de alelo; la mutación c.316-106C>G crea a su vez un sitio de restricción para las enzimas *RsaI* (GTAC) y *KpnI* (GGTACC). Un método general conveniente puede ser el **dot blot reverso**, en el que se puntea el panel de oligonucleótidos específicos de alelo sobre un filtro de nitrocelulosa, que se hibrida después con el producto amplificado de PCR de los genes de β-globina del paciente marcados. Las *Figuras 5.13* y *5.14* ilustran estos métodos.



Figura 5.13 – Identificación de la mutación p.Gln39X por PCR específica de alelo. El cambio C>T convierte el codón glutamina (CAG) en un codón de parada (TAG). Los cebadores C-específico y T-específico se utilizan con un cebador común que hibrida con una secuencia a la izquierda de la región mostrada. Una desunión puesta deliberadamente en posición 3 de cada cebador aumenta la especificidad de la reacción.



	sitio *Kpn*I	producto PCR no diferido	producto PCR *Kpn*I diferido
secuencia normal	ausente	406 nt	406 nt
c. 316–106 C>G	presente	406 nt	300 + 106 nt

Figura 5.14 – Identificación de la mutación c.316–106C>G.
La mutación crea un sitio de restricción para KpnI (GGTACC) en el intrón 2 del gen de la β-globina. El tamaño esperado del fragmento incluido el sitio de mutación se amplifica por PCR y el producto se incuba con la enzima de restricción.

CASO 6 | Familia Fletcher | 5 | 12 | 67 | **131** | 152 | 376

- Frank, 22 años, con progresiva vista borrosa
- Historia familiar de problemas visuales
- El árbol genealógico sugiere una herencia recesiva ligada al X, pero no es concluyente
- ? LHON
- Petición de análisis sanguíneo para comprobar mutaciones en el ADNmt
- Comprobación de mutaciones mediante pirosecuenciación

LHON (OMIM 535000) ocasiona una función inadecuada de la mitocondria causada por mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt). La confirmación del diagnóstico de Frank va a depender de la demostración de la presencia de una mutación. La genética molecular del LHON es bastante complicada. Se han asociado con la enfermedad 18 mutaciones puntuales diferentes en el ADNmt. Probablemente hay muchas maneras de deteriorar la función de la mitocondria desencadenando la enfermedad. Cinco de las 18 mutaciones tienen un efecto lo suficientemente grave para causar el LHON por sí solas; las demás se encuentran combinadas unas con otras.

Tres mutaciones puntuales causan la mayor parte de los casos, al menos en personas de origen europeo (se utiliza la nomenclatura de ADNmt):

- G11778A: sustitución de A por G en el nucleótido 11778 de los 16,5 kb del genoma mitocondrial. Esto da como resultado el cambio de una arginina 340 por una histidina en la proteína ND4 que es parte de la maquinaria oxidativa de fosforilación.
- G3460A: el cambio G→A sustituye la alanina 52 por tirosina en la proteína ND1.
- T14484C: la sustitución de este nucleótido sustituye la metionina 64 en la proteína del gen **ND6** por valina.

El procedimiento normal de diagnóstico comienza con una comprobación de estas tres mutaciones. Si ninguna está presente, se necesita una búsqueda más amplia, que puede incluir la secuenciación de parte de ADNmt.

Cualquiera de los métodos explicados con anterioridad se puede utilizar para comprobar las mutaciones más frecuentes. La *Figura 5.15* muestra el método basado en la restricción enzimática para la mutación G11778A. Un método alternativo es la pirosecuenciación (*Figura 5.16*), que tiene la ventaja de ser cuantitativo. Los individuos para las mutaciones mitocondriales pueden ser homoplásmicos

o heteroplásmicos, por lo que el análisis completo debe incluir las cantidades relativas de mitocondria normal y mutada. El resultado de Frank mostraba que era homoplásmico para la mutación G3460A.

	SECUENCIA			TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS	
				*Sfa*NI	*Mae*III
	11770	11780	11790		
normal	CGAACGCACT	CACAGTCGCA	TCATAATCCT	417 + 91	233 + 218 +57
	11770	11780	11790		
G11778A	CGAACGCACT	CACAGTCACA	TCATAATCCT	508	233 + 131 + 87 + 57

Figura 5.15 – Detección de la mutación G11778A por su efecto en los sitios de restricción. La mutación elimina un sitio de restricción de la enzima SfaNI (GCATC), pero crea uno para la enzima MaeIII (GTNAC, donde la N puede ser cualquier nucleótido). El ensayo muestra una amplificación por PCR de una porción de 508 pb del ADNmt que incluye al nucleótido 11778. Las muestras de producto de PCR son digeridas por separado con las dos enzimas y se separan los fragmentos por tamaño de mediante electroforesis. Los sitios de restricción están subrayados; el cambio de nucleótido está destacado con color y se muestra el tamaño de los fragmentos.

5.4. Resumen y ampliación

Las tres preguntas

La viabilidad y metodología del análisis de mutaciones va a depender de la precisión con la que nos interroguemos. Consideremos estas tres preguntas:

(1) ¿Tiene Joanne Brown (Caso 2) alguna mutación en algún gen que pueda explicar su enfermedad?
(2) ¿Tiene Joanne Brown alguna mutación en el gen CFTR?
(3) ¿Tiene Joanne Brown la mutación p.F508del del gen CFTR?

La pregunta (3) es rápida y fácil de contestar con cualquiera de los métodos descritos en la sección para detectar cambios específicos en la secuencia. Esta sección describe a su vez las circunstancias para responder a esta cuestión.

La pregunta (1) no se puede contestar hoy en día. En los próximos 10 años los avances técnicos harán posible secuenciar cualquier gen de un individuo, o incluso el genoma completo de una persona de manera tan fácil y económica que se convertirá en un procedimiento de rutina. Incluso con esto, es posible que aun teniendo el genoma completo de una persona, los genetistas no puedan contestar a una pregunta tan amplia. Muchas de las características humanas dependen de la combinación de varias, quizá de muchas variantes. Conseguir el conocimiento suficiente para predecir el efecto de cualquier combinación de varios millones de variantes puede llegar a ser posible, pero tardará.

La pregunta (2) en principio siempre tiene respuesta, pero su coste dependerá del número de exones que sean analizados. En el caso de Nasreen Choudhary (Caso 3) existen más de 50 genes candidatos para la sordera, un total de muchos cientos de exones. La búsqueda de mutaciones no sería viable hasta que se reduzca el campo a uno o varios genes. Cómo se va a realizar para este caso

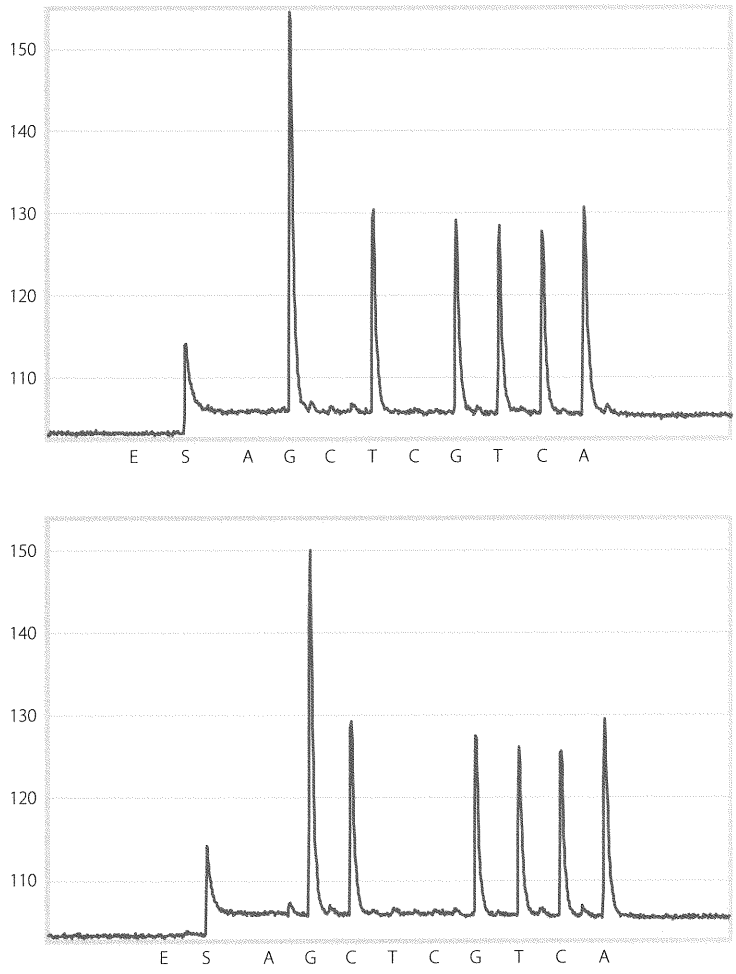


Figura 5.16 – Detección de la mutación G3460A por pirosecuenciador.
La máquina de pirosecuenciación trata de unir un nucleótido a cada extremo del cebador. La unión exitosa da lugar a una reacción bioluminiscente registrada por la máquina como un pico. Gráfica superior: secuencia mutante GTGTCA; gráfica inferior: control normal GCGTCA (las secuencias son de la cadena antisentido).

particular será descrito en el *Capítulo 9*. Para Joanne Brown (Caso 2) solo hay un gen candidato: la fibrosis quística siempre está causada por mutaciones en el gen *CFTR*. Analizar todo el gen implicaría analizar sus 27 exones. Lo lejos que llegue un laboratorio en tratar de contestar a la cuestión (2) dependerá de cuánto gasto puede ser justificado en relación con la importancia clínica de la respuesta. El aumento de la automatización y la utilización de las técnicas descritas con anterioridad están aumentando rápidamente la capacidad de los laboratorios.

Detección de mutaciones utilizando chips

Los microarrays (chips de ADN) proporcionan la posibilidad de realizar un gran número de análisis de hibridación en paralelo. Como se describe en el *Capítulo 4*, los microarrays contienen cientos o incluso cientos de miles de sondas diferentes

de ADN ancladas en un soporte sólido. Cada celda del array contiene muchas moléculas de una sonda en concreto. El diseño básico puede ser implementado de varias maneras. En el *Capítulo 4* las sondas eran fragmentos largos de ADN natural (clones BAC) y el microarray era utilizado para detectar variantes de número de copia a gran escala por hibridación genómica comparativa. Un diseño alternativo utiliza los arrays de oligonucleótidos sintéticos que son lo suficientemente cortos para que un apareamiento erróneo afecte a la eficiencia de hibridación. Los arrays de oligonucleótidos pueden ser utilizados para analizar una muestra de ADN para una gran variedad de cambios de nucleótidos.

- Las sondas pueden ser oligonucleótidos que cubren sistemáticamente la secuencia de un gen. El oligo #1 puede unirse a los nucleótidos 1-25 del ADNc, el oligo #2 puede unirse a los nucleótidos 2-26, y así en adelante en uno o varios genes. Cualquier variación en la secuencia del análisis de ADN puede ser revelada por un patrón de reducción o ausencia de hibridación de algunos oligos. Estos "chips de resecuenciación" llevan también oligos que se unen a cualquier posible sustitución de nucleótidos únicos en el gen en estudio. En un solo experimento, la secuencia completa de un gen largo se puede analizar en busca de sustituciones de un solo nucleótido.
- Las sondas pueden ser oligonucleótidos elegidos para detectar series completas de mutaciones en todos los genes candidatos de una enfermedad concreta. Por ejemplo, esto puede dar solución al problema de la sordera en la que hay que estudiar 50 genes candidatos o para la búsqueda de mutaciones en todos los genes identificados como posibles causas del síndrome del QT largo (Ver *Cuadro de enfermedad 5*). Sin embargo, solo podremos analizar un conjunto de mutaciones predefinidas en estos genes. Si el paciente tiene una mutación nueva es probable que se pierda. Estos chips pueden, por tanto, ser utilizados como primera búsqueda para encontrar las mutaciones de la mayoría de muestras. Las que sean negativas en esta búsqueda necesitarán ser investigadas por otros métodos.
- Se utiliza una variante del tipo de chip anterior para genotipar a gran escala una muestra para polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) sin significado patológico.

Los microarray son una parte muy importante en el análisis de ADN del futuro. Cada chip puede ser utilizado para analizar una muestra una única vez. Esto los hace caros, pero hay que tener en consideración el coste del trabajo, ya que la utilización de chips puede ser rentable al compararse con la amplificación y secuenciación de cada exón de un gen de gran tamaño. Los costes de la puesta apunto son elevados: la compañía comercial debe desarrollar, manufacturar y validar un array apropiado y el laboratorio debe comprar el equipamiento que necesite para utilizar y leer los arrays. Por esta razón, la mayor aplicación de los chips en diagnóstico sea probablemente para análisis que deben hacerse muchas veces; análisis mutacionales para, por ejemplo, el cáncer de mama u otras enfermedades relativamente comunes. Muchas enfermedades mendelianas son demasiado infrecuentes para justificar el coste de desarrollar un chip específico. Sin embargo, para las familias afectadas una enfermedad infrecuente es muy importante, por lo que las "enfermedades huérfanas" resultan un problema muy importante para los servicios de genética clínica.

Otros métodos para genotipar o secuenciar el ADN

Los métodos descritos en este capítulo son apropiados para la mayor parte de los propósitos de la genética clínica, cuando tienen que ser investigadas una o varias muestras de ADN. Algunos científicos necesitan analizar un gran número de muestras en busca de variantes específicas. Los laboratorios que investigan factores genéticos de susceptibilidad de enfermedades frecuentes (ver *Capítulo 13*) necesitan genotipar un gran número (p. ej.: 5000-500.000) de polimorfismos específicos no patológicos en cientos o miles de muestras. Los mayores laboratorios pueden generar millones de genotipos cada semana. Cualquier análisis poblacional a gran escala que puede ser implementado en el futuro requiere también técnicas especiales. El **genotipado de alto rendimiento** utiliza métodos altamente automatizados para genotipar variantes específicas en miles de muestras. Esto requiere técnicas diferentes a las explicadas hasta ahora. El factor clave común es la necesidad de eliminar la electroforesis, que es una técnica difícil de ampliar al nivel requerido. Las tecnologías disponibles incluyen el uso de espectrómetro de masa para identificar los fragmentos de ADN por su masa molecular y la hibridación del ADN problema con millones de granos microscópicos, cada uno de ellos marcado con un fluoróforo específico o con un código de barras molecular que permita que los granos sean rápidamente clasificados e identificados. Estos métodos no forman parte de los análisis clínicos y están más allá del alcance de este libro; se encuentran descripciones en Church (2006) y Sellner y Taylor (2004).

Además del desarrollo de métodos de genotipado de alto rendimiento, muchas compañías y grupos académicos están trabajando en nuevas tecnologías de secuenciación. Uno de sus objetivos es desarrollar tecnologías que permitan que un gen específico; por ejemplo el *BRCA1*, sea secuenciado de manera más barata en una gran colección de muestras. Un segundo objetivo es el de reducir el coste de secuenciar un genoma individual en varios órdenes de magnitud. En febrero de 2004 el US Nacional Institute for Human Genome Research hizo una llamamiento para presentar propuestas de desarrollo de "tecnologías revolucionarias de secuenciación genómica" que condujera a la capacidad de secuenciar el genoma completo de una persona en una semana por unos 1000 dólares. Varios laboratorios y compañías han aceptado el desafío.

5.5. **Referencias**

Sellner LN y Taylor GR (2004) MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Hum. Mutat.* **23**: 413–419.

Church GM (2006) Genomes for All. *Sci. Amer.* **294**: 47–54.

Choi G *et al.* (2004) Spectrum and frequency of cardiac channel defects in swimming-triggered arrhythmia syndromes. *Circulation,* **110**: 2119–2124.

La edición de enero de 2006 de *Clinica Chimica Acta* (**363** nos.1-2) consiste en una serie de revisiones sobre el "Presente y futuro de los métodos rápidos y/o de alto rendimiento para analizar ácidos nucleicos". Son bastante técnicos, pero cubren todos los métodos avanzados aquí mencionados y algunos más.

Síndrome QT largo

Durante años se ha reconocido ampliamente que la muerte súbita puede darse en personas jóvenes aparentemente sanas sin que haya ninguna clave en el examen post-mortem que pueda explicar por qué ha ocurrido esa tragedia. Algunas veces más de un individuo de una familia puede estar afecto. En los últimos años han sido descubiertos dos grandes grupos de enfermedades que causan muerte en adultos sin que existan signos obvios post-mortem: el síndrome del QT largo y las miocardiopatías. En el último grupo puede haber síntomas previos y, en algunos individuos, una clara hipertrofia en el estudio post-mortem. Sin embargo, algunos individuos pueden no tener síntomas y los signos histológicos solo pueden ser detectados por expertos en este campo.

Los síndromes de QT largo se caracterizan por anomalías en el ECG (*Figura 1*). Estas consisten en una prolongación del QT (indicando una repolarización ventricular prolongada o alterada) y anormalías en la onda T asociadas con una tendencia a la taquicardia (latidos rápidos del corazón) que pueden causar síncope (desmayos). Las convulsiones ocurridas durante el síncope puede hacer que se equivoque el diagnóstico por el de epilepsia. Con frecuencia estos episodios acaban por sí solos, pero pueden progresar hasta la fibrilación ventricular, por lo que el corazón deja de bombear sangre de manera efectiva y acaece la muerte súbita. En el 10-20% de todos los casos de ahogo, la causa puede ser el QT largo u otras enfermedades arritmogénicas (ver Choi *et al.*, 2004). El síndrome del QT largo puede explicar también algunos casos de muerte súbita.

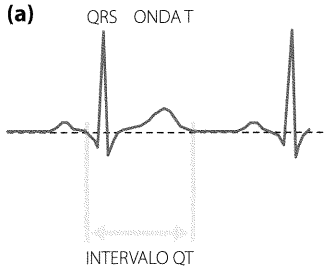


Figura 1 – (a) Intervalo QT y (b) parte de un electrocardiograma que muestra un intervalo QT largo (535 ms). Cortesía del Dr. Kay Metcalfe, St. Mary's Hospital, Manchester.

Se han descrito familias en las que la enfermedad tiene una transmisión compatible con la herencia dominante, pero en otras se ha descrito que los individuos afectos tienen sordera sensorineural y una herencia autosómica recesiva. Los de tipo dominante (*Figura 2*) han sido agrupados en el llamado síndrome Romano-Ward (OMIM 192500) y los de tipo recesivo en los síndromes Jervell y Lange-Nielsen (JLN; OMIM 220400). Los individuos afectos para el JLN tienen pérdida profunda de la audición sensorineural y un intervalo QT largo. La mitad de los individuos no tratados fallecen antes de los 15 años de edad.

El principal problema es el mal funcionamiento de alguno de los canales iónicos que son importantes para regular el ritmo cardíaco. Los estudios de ligamiento revelan que los síndromes Romano-Ward y el JLN son heterogéneos, con diferentes loci implicados en diferentes familias. Se han descubierto mutaciones que implican a los siguientes genes de canales iónicos.

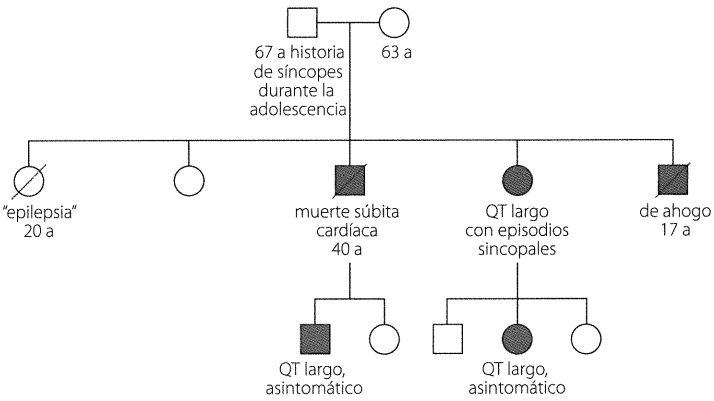


Figura 2 – Árbol genealógico de una familia en la que se está segregando el síndrome del QT largo dominante.

- *KCNQ1* y *KCNE1*: codifican componentes de los canales de potasio IKs. Los pacientes de Romano-Ward pueden ser heterocigotos y los pacientes JLN, homocigotos para mutaciones en cualquiera de los genes. Los síncopes, y la muerte súbita en particular se desencadenan por el esfuerzo físico, especialmente por la natación.
- *KCNH2* y *KCNE2*: codifican componentes del canal de potasio IKr. Se han descrito mutaciones heterocigotas en cualquiera de los genes en algunos pacientes de Romano-Ward. La excitación emocional o los ruidos altos (especialmente los que pueden despertar a alguien) son los desencadenantes más comunes de la muerte súbita.
- *SCN5A*: codifica un canal cardíaco de sodio. Han sido descritas mutaciones heterocigotas en algunos pacientes de Romano-Ward. La muerte más frecuente se da durante el descanso tranquilo o el sueño.

En el *Capítulo 6* se discutirá los motivos por los que las mutaciones en *KCNQ1* y *KCNE1* pueden causar cualesquiera de estos síndromes con diferentes modos de herencia. Más del 30% de las familias no tienen una mutación detectable en ninguno de estos genes. La relación genotipo-fenotipo es más complicada por el hecho de ser enfermedades aparentemente distintas; el síndrome de Brugada (OMIM 601144) puede estar causado por mutaciones en el gen *SCN5A*. En esta enfermedad aparece fibrilación ventricular y muerte súbita, pero las anomalías del ECG son diferentes (semejando un bloqueo completo de rama derecha con elevación variable del segmento ST) o pueden estar ausentes sin provocación.

Tras un acontecimiento catastrófico como la muerte súbita, en especial en una persona joven, los familiares próximos sufren una gran ansiedad. El análisis y el consejo genético pueden proporcionar seguridad a estos individuos con riesgo de muerte súbita. Se realizará una historia familiar detallada, haciendo hincapié en la historia de síncopes o de "convulsiones" sin explicación. Se deberá determinar en los familiares de primer grado la evidencia del síndrome de QT largo. Es deseable identificar la mutación causativa, de tal forma que se pueda determinar qué familiares están en riesgo. El tratamiento para todas las enfermedades del síndrome QT largo se dirige a evitar los factores desencadenantes conocidos, reduciendo la tendencia a la taquicardia mediante el uso de medicación beta-bloqueantes, y para algunos, el uso de desfibriladores implantables cardioversores. Conociendo la mutación específica con anticipación se puede permitir realizar medidas encaminadas a evitar los factores desencadenantes específicos. Sin embargo, debido a que cualquiera de los genes puede estar implicado, el diagnóstico molecular encuentra problemas similares a los de las familias con sordera (ver **Caso 3, familia Choudhary**).

5.6. Ejercicios de autoevaluación

(1) Elija los posibles métodos para cada uno de los siguientes cambios de secuencia o efectos de la siguiente lista que puede servir para comprobar la presencia de un cambio o efecto (los métodos pueden ser apropiados para más de un caso).

- Mutación puntual en cualquiera de los 26 exones del gen *F8*.
- Duplicación de los exones 50-54 del gen de la distrofina en un niño con distrofia muscular de Duchenne.
- Expansión de repeticiones $(CAG)_n$ en el gen *SCA3* de una mujer que se sospecha tiene la enfermedad de Machado-Joseph.
- Identificación de un pequeño "marcador" adicional cromosómico visto en un bebé con dismorfismo.
- Inserción de 4 nucleótidos en el exón 7 del gen de la distrofina en la hermana de un niño que se sabe que tiene esta mutación.
- Deleción de cualquiera de los 20 exones del gen de la distrofina en un niño con distrofia muscular de Duchenne.
- Una mutación A>G en el exón 4 del gen *OCRL*.
- Deleción de cualquiera de los 20 exones del gen de la distrofina en la madre de un niño muerto por distrofia muscular de Duchenne.
- Una deleción de 1.5 Mb en 7q11.23 en un niño con sospecha de síndrome de Williams-Beuren.
- Pérdida de expresión en linfocitos de un gen aparentemente intacto que se expresa habitualmente en estas células.
- Deleción de los exones 5-6 de un gen del cromosoma 15 en un niño con retraso mental.
- Mutación puntual en cualquier lugar (exones o intrones) del gen β-globina.

Posibles métodos:

- Cariotipado
- FISH
- Array CGH
- *Southern blotting*
- *Northern blotting*
- MLPA
- PCR: comprobar la presencia/ausencia de producto
- PCR: tamaño de producto
- PCR: secuenciación de producto
- PCR: comprobar por digestión de restricción de producto
- PCR: específica de alelo
- PCR: transcriptasa inversa
- SSCP (polimorfismos conformacionales de cadena sencilla)
- Hibridación con un oligonucleótido alelo-específico
- Secuenciación de Sanger
- Pirosecuenciación

(2) Para cada uno de los siguientes análisis, tenga en cuenta si se utilizan las propiedades de cadena sencilla o de doble cadena de ADN:

- Comprobar movilidad de heterodúplex en un gel
- *Dot-blotting* con oligonucleótidos alelo-específicos
- Gel de electroforesis sensible a la conformación
- Comprobación de la creación/pérdida de un sitio de restricción específico de alelo por PCR
- Cromatografía líquida de alto rendimiento parcialmente desnaturalizante (dHPLC)
- Secuenciación utilizando un microarray
- FISH

(3) La enzima de restricción *Eco*RI corta la secuencia GAATTC. Parte de la secuencia de un gen es:

```
CAA  AAC  CTC  AAG  TCA  ACG  AGT  TCG  GTA  ACG  TAC
Gln  Asn  Leu  Lys  Ser  Thr  Ser  Ser  Val  Thr  Tyr
```

Esta parte del gen es amplificado por PCR del ADN de un paciente con una enfermedad que a menudo está causada por mutaciones en este gen. Sepa que el producto de PCR, que en los individuos normales no se corta con *Eco*RI, se corta ahora en dos fragmentos. Asumiendo que la mutación cambia un único nucleótido en el segmento mostrado, identifíquelo.

Biblioteca

Capítulo **6**

¿Qué hacen las mutaciones?

Conceptos y habilidades que aprenderá en este capítulo

Después de estudiar este capítulo será capaz de:

- Describir e identificar cambios en la secuencia codificada como silente, cambio de sentido, sin sentido o de patrón de lectura y mutaciones de sitio de *splicing*.
- Emplear la tabla del código genético para definir el efecto de un cambio en la secuencia codificada en el producto de un gen.
- Explicar y dar ejemplos de pérdida de función, ganancia de función, haploinsuficiencia, efecto dominante negativo, sinsentido mediado por degradamiento o sensible a dosis.
- Discutir cómo se establecerán las correlaciones genotipo-fenotipo.
- Enumerar las formas en las que un cambio en el ADN no codificante puede afectar a la expresión de un gen.

6.1. Historias clínicas

CASO 15 | Familia O'Reilly | **141** | 154 | 376

- Historia familiar de miopía y problemas de cadera
- Orla tiene miopía severa, es baja y tiene problemas de cadera
- ? Síndrome de Stickler

Orla O'Reilly, que está casada con Raymond, ha llevado gafas por miopía severa desde que era niña. Sólo mide 150 cm de estatura. Su hermano Oliver es también bajo y miope, y nació con paladar hendido. Él también lleva audífonos. Ambos se parecen a su padre, que es bajo y fornido, y ha necesitado recientemente una prótesis bilateral de las caderas; cuando tenía 35 años fue sometido a cirugía por un desprendimiento de retina en un ojo y a tratamiento con láser para prevenir un desprendimiento en el otro ojo. Orla fue a un chequeo médico por un seguro y mencionó que había padecido algún dolor en las caderas. El médico que le hizo la revisión había estado en un curso de genética y, antes de hacer la historia familiar, pensó que podría haber una conexión entre los problemas médicos de Orla y los de Oliver y los de su padre; por ello la remitió a una clínica genética. Allí a Orla le hicieron un detallado examen que incluía un test de ojos en el cual, además de la miopía, mostró que ella tenía una retinopatía con entramado paravascular. El médico también observó que tenía la nariz corta con un puente nasal plano y articulaciones nudosas. El médico dijo a Orla que sospechaba que pudiera tener una enfermedad llamada síndrome de Stickler. Esta enfermedad es debida a una mutación en los genes que codifican componentes del tipo II o del tipo IV del colágeno. Ver Snead y Yates (1999) para una revisión.



(a) (b) (c)

Figura 6.1 – (a) Un lactante con síndrome de Sticker; apréciese la mandíbula pequeña (frecuentemente asociada con paladar hendido) y la cara plana con ojos prominentes. (b) Rasgos faciales de un niño de 4 años con síndrome de Stikler. (c) Típica degeneración pigmentaria del entramado vascular retiniano. (b) y (c) reproducidas de Snead y Yates (1999) con permiso del Grupo BMJ Publicaciones.

6.2. **Antecedentes**

La palabra "mutación" puede ser empleada para describir el hecho que produce una variante en la secuencia de ADN, o el resultado de una variante, producida aquí y ahora, o heredada quizás a través de varias generaciones. En otras palabras, puede describir el proceso o su producto. Aquí la empleamos para indicar el producto. Nótese, de paso, que en el consejo genético el término "mutación" raramente es empleado en debates con pacientes, en parte para evitar la jerga científica, pero también por su connotación peyorativa (*mutantes...*). Una mutación puede ser descrita como un "cambio genético", "alteración" o "fallo".

En los dos últimos capítulos se habían visto algunos de los métodos empleados para detectar variantes en la secuencia de ADN, y en algunos casos considerar sus efectos, por ejemplo en el Caso 12 (familia Lawton) la gran inversión altera el gen F8. En este capítulo profundizaremos más sistemáticamente en los efectos de los cambios de secuencias. Hay dos aspectos a considerar:

- Por un lado, necesitamos entender cómo un cambio en la secuencia puede afectar al proceso básico de la trascripción y traslación.
- Por otro, queremos pensar en términos de la función global del gen; si hay una pérdida o ganancia de función, y cómo el genotipo predice el fenotipo.

En esta sección trataremos la trascripción y la traslación. Para que una secuencia codificante de una proteína funcione como propone el Dogma Central (*Figura 3.3*), se necesitan una serie de pasos. Algunos de estos pasos pueden estar afectados por una mutación. El *Cuadro 6.1* resume los tipos de cambios que se tratarán. La *Sección 6.3* proporciona una serie de ejemplos que nos llevan a una discusión de la patología molecular en la última sección del capítulo, incluyendo pérdidas o ganancias de función y posibilidades para la correlación genotipo-fenotipo. El *Cuadro de enfermedad 6* ilustra, con un llamativo ejemplo, cómo pérdidas, modificaciones o ganancias de función en el mismo gen pueden producir un grupo de fenotipos muy diferentes.

Cuadro 6.1

Resumen de los tipos de mutaciones estudiados en esta sección

En términos del ADN, las mutaciones pueden ser clasificadas como:

- deleciones de un gen entero
- duplicaciones de un gen entero
- interrupciones de un gen por un reordenamiento cromosómico
- deleciones o duplicaciones de uno o más exones de un gen
- mutaciones en el promotor o en otras secuencias reguladoras cis-activantes
- mutaciones que afecten al *splicing* por alteraciones del sitio de *splicing*
- mutaciones que afecten al *splicing* por activación de una región críptica de *splicing*
- mutaciones que alteren el marco de lectura del triplete (cambios en el patrón de lectura)
- mutaciones que introducen prematuramente un codón stop (mutaciones sin sentido)
- mutaciones que reemplazan un aminoácido por otro en la proteína (mut. de pérdida de sentido)
- mutaciones que cambian un codón para un aminoácido en otro codón para el mismo aminoácido (sustituciones sinónimas)

Por otro lado, las mutaciones pueden ser clasificadas como nulas o amórficas (el producto no se hace o no hay función), hipomórficas (el producto es demasiado pequeño o tiene muy poca función) e hipermórficas (demasiado producto o función excesiva).

Deleción o duplicación de un gen entero

En este caso podría esperarse un aumento o disminución de la cantidad del producto del gen, proporcional al cambio en el número de genes, aunque puede ser modificado por controles de regulación *feedback* del nivel de expresión de acuerdo con la necesidad del producto del gen. No todas las deleciones o duplicaciones son patogénicas. Recientemente se empieza a ver que hay considerables variaciones en el número de copias de algunos genes en la población normal. La hibridación genómica comparativa (*Figura 4.7*) reveló una inesperada variabilidad del número de copias que eran comunes y, evidentemente, no-patogénicas. Otros ejemplos de duplicaciones o deleciones comunes no-patogénicas son:

- las personas varían en el número de repeticiones en tándem de los genes del pigmento de la visión del color verde en el cromosoma X
- las personas varían en el número de genes de beta-defensina en 8p23
- algunos de los haplotipos importantes de complejos de histocompatibilidad en 6p21 (ver *Capítulo 8*) contienen diferente número de genes de HLA

Para la mayoría de los genes, los cambios en el número de copias son anormales y con frecuencia, patogénicos. Un gen es llamado **sensible a dosis** si un aumento o disminución en el número de copias (tener 1 o 3 copias del gen que normalmente está presente en 2 copias) causa cambios fenotípicos. Las duplicaciones son menos comunes que las deleciones y es menos probable que sean patogénicas (aunque las trisomías cromosómicas deben producir su efecto patogénico por el incremento de dosis de los genes del cromosoma en cuestión; ver *Sección 6.4*).

Interrupción de un gen

Si un gen se interrumpe por un reordenamiento cromosómico, el fragmento 5′ del gen retiene el promotor y todavía puede ser trasncrito, pero no podría producir

la trascripción de la longitud entera. La inversión del Factor VIII que se encontró en Lennox Lawron (Caso 12, ver *Figura 4.12*) es un ejemplo. La estabilidad de un ARNm está mediada por la región 3′ no traducida, por lo que el ARNm parcial es poco probable que sea estable. A veces un reordenamiento cromosómico puede crear un nuevo gen quimérico al unir exones de dos genes diferentes. Estos cambios son importantes en el cáncer (ver *Capítulo 12*) y son una excepción a la regla que dice que la interrupción de un gen impide su expresión.

Mutaciones que afectan la transcripción de una secuencia codificante intacta

Aquí la preocupación son los efectos que **actúan en *cis;*** efectos específicos de un cambio en la secuencia de ADN de un gen inmediatamente adyacente. Estos son diferentes de los efectos que **actúan en *trans,*** donde el causante de mutaciones afecta a la expresión de genes distantes, con frecuencia en diferentes cromosomas. Los efectos que actúan en *trans* suelen ser consecuencias de secuencias-abajo de un suceso que actúa en cis. Hemos visto un ejemplo con ATRX (*Cuadro de enfermedad 2*). En esta enfermedad, las mutaciones afectan a los complejos de remodelación de la cromatina que causan cambios en la expresión de muchos genes. De forma similar, las mutaciones en los genes que codifican factores de trascripción pueden afectar a la expresión de otros muchos genes. Los cambios que actúan en *cis* solo afectan directamente al gen inmediatamente adyacente a la secuencia cambiada, aunque los cambios en la expresión de uno de estos genes pueden tener otros tipos de efectos que actúan en trans secuencias abajo en otros genes.

Cambios en el promotor. Un complejo de iniciación activo (ver *Sección 3.4*) puede estar ensamblado en el promotor, permitiendo a la ARN polimerasa hacer el primer transcrito. Las mutaciones que eliminen o alteren los sitios de unión para los factores de trascripción pueden suprimir, reducir o en algunas ocasiones aumentar la trascripción de un gen. El producto del gen es normal, pero está presente en una cantidad errónea o en un tejido erróneo. Es muy difícil predecir el efecto probable de un cambio secuencia-arriba en la secuencia de un gen. Hay programas disponibles que identifican el sitio probable de unión del factor de trascripción, pero tienden a registrar un gran número de sitios posibles de unión y no tienen en cuenta las interacciones proteína-proteína entre varios factores, por lo que tienen un poder predictivo limitado.

Los efectos de los cambios en el promotor pueden ser investigados en el laboratorio usando el ensayo de trasfección transitoria. Un gen cuya actividad es fácilmente monitorizada (ß-galactosidasa es el más empleado) se sitúa en un vector donde su expresión es gobernada por el promotor sometido a estudio. El vector recombinante se introduce en una célula y se mide el nivel de expresión. Esto se puede comparar con el nivel observado cuando se emplea el promotor original. Los ensayos de transfección transitoria son armas de investigación valiosas, pero sus resultados deben ser tomados con gran precaución. No es necesario decir que muchos de estos tests no son parte de la investigación diagnóstica de rutina.

Cambios en otras secuencias reguladoras. Así como la región promotora se sitúa inmediatamente secuencias abajo del sitio de comienzo de la trascripción, los elementos reguladores que actúan en *cis* pueden estar localizados mucho más lejos y en cualquier dirección a partir de la secuencia codificante. Actualmente se entienden poco. El primero que hemos conocido había sido descubierto por casualidad en observaciones de deleciones o reordenamientos cromosómicos que tienen como puntos de corte decenas o centenas de kilobases en dirección opuesta al gen y afectaba a su expresión. Un gran proyecto de colaboración internacional, el proyecto ENCODE (Enciclopedia de elementos del ADN, www.genome.gov/10005107) está intentando definir todos los elementos reguladores en una muestra del 1% del genoma humano. La principal estrategia es buscar en las secuencias no-codificantes que están altamente conservadas en un gran número de organismos, asumiendo que parte de las secuencias conservadas implican una secuencia de función-específica. Eventualmente ENCODE podrá ayudar dirigir búsquedas masivas de mutaciones reguladoras.

En resumen, las mutaciones reguladoras son muy difíciles de identificar. Pueden tener gran relevancia en las enfermedades multifactoriales complejas (*Capítulo 13*), donde probablemente muchos factores de susceptibilidad cambian algo el nivel de expresión de un gen intacto, al contrario de las enfermedades mendelianas, que tienden a tener mutaciones de efectos amplios.

Mutaciones que afectan al *splicing* del primer transcrito

***Eliminación o modificación de sitios de* splicing.** Cualquier cambio en los dinucleótidos (casi) invariables GT...AT que marcan el comienzo y el final de los intrones impedirá que el sitio afectado empiece a usarse. Lo que haga la célula en respuesta a esto es difícil de predecir. El exón implicado puede saltarse o la secuencia desde el intrón puede retenerse en el ARNm maduro. Frecuentemente otros sitios cercanos se emplean como un sitio de reemplazamiento de *splicing*, con los cambios consiguientes en la secuencia del ARNm maduro. Otros cambios cercanos a la unión exón-intrón también suelen afectar frecuentemente al *splicing*, pero de manera menos previsible. Como se mencionó en el *Capítulo 3* (*Figura 3.11*), las secuencias GT...AG solo funcionan como sitios de *splicing* cuando están incrustadas en una secuencia de consenso definida imprecisamente. Además, el correcto funcionamiento de un sitio de *splicing* depende del aumento o supresión sobre el *splicing* de las secuencias cercanas que unen los componentes de la maquinaria del *splicing*. De nuevo, estas no están definidas rígidamente. Los potenciadores pueden estar localizados en el intrón cercano al sitio de *splicing*, pero también pueden situarse en el exón. Si un cambio dentro de la secuencia altera un potenciador de *splicing* exónico, puede ser patogénico por razones inconexas. Dos ejemplos pueden ilustrar estos efectos:

- Cerca del extremo 3′ del intrón 8 del gen *CFTR* hay una serie de nucleótidos T. En personas diferentes puede ser 5, 7 o 9 T. La variante 5T produce un uso ineficiente del sitio de *splicing* cercano; el exón 9 se salta frecuentemente, produciendo una pérdida de función que es sólo un parte parcial, porque una proporción de transcripciones tienen un *splicing* correcto. Así, la variante 5T está asociada con una forma de fibrosis quística leve y atípica.

- La atrofia muscular espinal (SMA o enfermedad de Werdnig-Hoffmann, OMIM 253300) está causada por la pérdida de función del gen *SMN1* en 5q13. Una copia duplicada del gen (*SMN2*) situada a solo 500 kb en el mismo cromosoma a primera vista debería ser capaz de reemplazar la función del gen mutado. Aparentemente, los dos genes solo tienen secuencias diferentes insignificantes. Una de estas es un cambio T>C en el exón 7, 6 nucleótidos abajo del sitio 5′ de *splicing*. La sustitución parece que solo reemplaza un codón fenilalanina con otro (TTT>TTC). Pero el hecho es que este cambio inactiva un potenciador de *splicing* exónico, por lo que el exón 7 tiene un *splicing* correcto únicamente en una pequeña minoría de transcripciones, y el gen *SMN2* es ampliamente no-funcional. Curiosamente, algunos pacientes SMA tienen varias copias de este gen. Aunque cada una produce muy poca proteína, juntas pueden producir la suficiente como para hacer que en estos pacientes la enfermedad sea leve.

***Creación de un nuevo sitio de* splicing.** Algunos cambios en la secuencia afectan al *splicing* por activación de un **sitio críptico de *splicing*.** Esto es, hay secuencias que, por casualidad, tienen muchas de las características de un sitio de *splicing*, pero son lo bastante diferentes como para que la célula no lo confunda con el sitio real de *splicing*. Un cambio puede aumentar el parecido con el punto en el que la célula empieza a usarlo. Este sitio críptico puede estar en un exón o en un intrón, como se muestra en los siguientes ejemplos:

- En la hemoglobina E el gen ß-globina tiene una sustitución G>A, 14 nucleótidos secuencia arriba del extremo 3′ del exón 1. Esto podría predecir una sustitución de un aminoácido GLu26Lys. Pero el efecto patogénico está en el *splicing*. Cambiando este nucleótido hay un cambio de secuencia para ser usada como un sitio alternativo de *splicing*. Las transcripciones que emplean este sitio no son funcionales, y el efecto es una ß-talasemia.
- Una causa de fibrosis quística es una cambio de una sola base c.3849+10kb C>T, 10 kb dentro del intrón 19 del gen *CFTR*. Esto activa un sitio críptico de *splicing*, causando un *splicing* aberrante y una pérdida de función del gen.

***Cambiando el balance de las isoformas de* splicing**. Más que impedir la producción de cualquier transcrito funcional, las mutaciones de *splicing* pueden alterar simplemente el equilibrio entre las isoformas. Muchas transcripciones están sujetas al *splicing* alternativo. La media de diferentes transcripciones por locus encontrada por el proyecto ENCODE es 5,4 (aunque algunos de estos se deben al uso de promotores alternativos en el primer exón, a pesar del *splicing* alternativo de un solo transcrito). Si un cambio en la secuencia consenso de *splicing* o en el potenciador de *splicing* cambia la eficiencia del sitio de *splicing*, puede afectar al equilibrio de las isoformas de *splicing* y producir un fenotipo. De nuevo, tales cambios es más probable que actúen como factores de susceptibilidad de enfermedades comunes que en mutaciones de enfermedades mendelianas.

En resumen, los efectos en el *splicing* están muy extendidos pero, aparte de los cambios en los dinucleótidos invariables GT...AG, son muy difíciles de predecir. Están infravalorados porque solo pueden reconocerse si se estudia el ARNm, en vez del ADN genómico. Existen programas de ordenador que predicen el efecto de un cambio en la secuencia de *splicing*, pero los resultados son solo orientativos.

Mutaciones que causan errores en la traducción

Los efectos en la traducción de un cambio de secuencia en una secuencia de proteína-codificante deben considerarse en relación con el código genético (*Tabla 6.1*).

Tabla 6.1 – El código genético

1ª base en el codón	2ª base en el codón				3ª base en el codón
	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**

Algunos aminoácidos como la serina y la arginina tienen múltiples codones, mientras que el triptófano y la metionina tienen solo uno cada uno. AUG se duplica como el iniciador del codón y como el codón para metioninas internas. Obsérvense los tres codones de parada.

Mutaciones por cambio de patrón de lectura. Las inserciones o deleciones de un número de nucleótidos que no son múltiplo de tres producen **mutaciones de cambio de patrón de lectura.** El efecto cambia completamente la lectura de todo el mensaje hacia abajo del punto de la mutación (ver *Cuadro 3.3*). En principio, puede producirse un polipéptido completamente nuevo por traducción del ARNm con cambio de patrón de lectura. Incluso si tal proteína se produjera, sería inestable probablemente. Solo un subconjunto muy pequeño de los millones de posibles cadenas de polipéptidos pueden plegarse para producir una proteína estable. Las células detectan y degradan a las que fallan en su plegamiento de forma correcta. Lo más normal es que no se produzca un polipéptido nuevo. Es habitual que poco después de la zona con cambio de patrón de lectura se incluya un codón de parada. Como se explica a continuación, los ARNm contienen codones de terminación prematuros que normalmente se degradan y no producen proteínas. La *Figura 6.2* muestra un ejemplo de una mutación de cambio de patrón de lectura común que produce un codón de parada prematuro.

Deleción o duplicación entera de un exón. Cuando uno o más exones completos de un gen son delecionados o duplicados, el efecto dependerá parcialmente de si

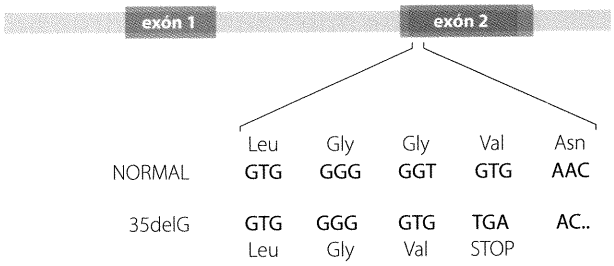


Figura 6.2 – La mutación c.35delG en el gen 26 de la conexina (*GJB2*). Este gen es una causa frecuente de sordera congénita autosómica recesiva. Se deleciona un nucleótido G de una serie de 6 G. Leyendo el mensaje con cambio de patrón de lectura el ribosoma rápidamente llega a un codón de parada. El gen *GJB2* tiene solo dos exones. La secuencia codificante se encuentra en negro; las partes coloreadas de los exones 1 y 2 codifican las regiones sin traducir de los extremos 5´y 3´del ARNm. El diagrama no está a escala.

se produce un cambio en el patrón de lectura. Las deleciones del exón entero en el gen de la distrofina proporcionan un ejemplo clásico. La *Tabla 6.2* enumera los tamaños de los exones que se muestra en la *Figura 3.9*. Los exones 41, 42, 47, 48 y 49 son múltiplos exactos de tres nucleótidos. Delecionando uno de estos exones no se produciría un cambio en el patrón de lectura. Los otros exones tienen algún nucleótido de más sobre un múltiplo de tres (+1) o uno de menos (-1). Delecionando uno de estos causaría un cambio en el patrón de lectura. La proteína distrofina es parcialmente funcional si un segmento interno se pierde o es duplicado, pero un cambio en el patrón de lectura la destruye completamente. Como resultado, las deleciones o duplicaciones que no provocan cambios de patrón de lectura causan una enfermedad leve, la distrofia muscular de Becker (BMD – OMIM 300386), mientras que las deleciones o duplicaciones de cambio de patrón de lectura (y otras mutaciones mayores) causan la distrofia muscular de Duchenne grave (DMD - OMIM 310200) como en el Caso 4 (Familia Davies). Por el efecto del cambio de patrón de lectura, las deleciones de muchos exones pueden tener un efecto contradictorio: combinando una mutación letal con una segunda mutación letal puede producirse una mutación no-letal. Por ejemplo,

Tabla 6.2 – Tamaño de los exones del gen de la distrofina

Exón	Tamaño (pb)	Marco	Enfermedad
41	183	0	BMD
42	195	0	BMD
43	173	–1	DMD
44	148	+1	DMD
45	176	–1	DMD
46	148	+1	DMD
47	150	0	BMD
48	186	0	BMD
49	102	0	BMD
50	109	+1	DMD

Las deleciones de los exones producen la distrofia muscular de Duchenne grave (DMD) o la distrofia muscular de Becker leve, dependiendo de si la deleción produce o no un cambio en el patrón de lectura. Ver texto para más explicación.

eliminando cualquier exón 43 o 44 se produce la DMD grave, pero alguien que tenga estos dos exones eliminados tiene una deleción de marco de lectura neutral y tendrá la BMD leve.

Mutaciones sin sentido. Los tres codones UAG, UAA y UGA en el ARNm son codones de parada (*Tabla 6.1*). Un cambio de un nucleótido que convierte algún otro codón en un codón de parada (TAG, TAA o TGA en el ADN) origina que los ribosomas detengan la síntesis de una proteína y termine en este punto. Estas mutaciones se denominan **mutaciones sin sentido.** Contrariamente a la creencia común, los ARNm que contienen mutaciones sin sentido normalmente no producen proteínas truncadas. Las células contienen un mecanismo muy interesante (**degradación mediada-sin sentido**) para detectar y degradar los ARNm que contienen codones de terminación prematuros (*Figura 6.3*). En algunos casos puede producirse, una cierta cantidad de proteína truncada pero el efecto usual de una mutación sin sentido es similar a la de una deleción completa del gen.

La degradación mediada-sin sentido se desarrolla para proteger a las células contra efectos tóxicos dominantes negativos de las proteínas truncadas (ver más abajo). Esto explicaría por qué el último exón de muchos genes es muy largo (no puede partir la región no traducida 3′ entre varios exones). Algunas diferencias algo desconcertantes entre los efectos de una mutación sin sentido en diferentes partes del mismo gen son el resultado de una degradación mediada sin-sentido que opera en la zona roja (*Figura 6.3*) pero no en la zona verde (ver OMIM 602229). Para más detalles véase la revisión de Holbrook *et al.* (2004).

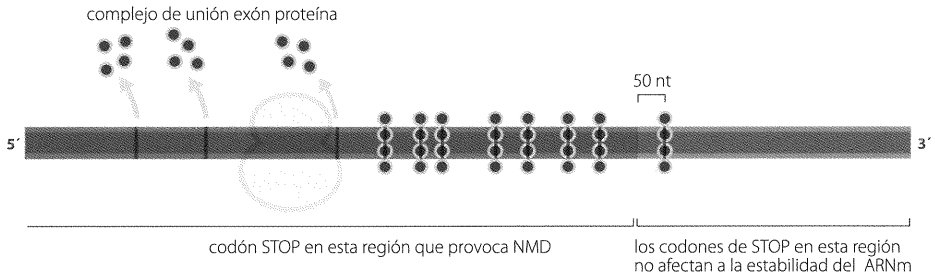


Figura 6.3 – Degradación mediada-sin sentido.
Cuando un ARNm cortado se exporta desde el núcleo al citoplasma, ciertos componentes de la maquinaria de *splicing* (el complejo de unión al exón, EJC) permanecen unidos a cada sitio de corte. Como el primer ribosoma se mueve a lo largo del ARNm, este desplaza cada EJC hasta alcanzar el codón de parada y se separa. Si esto ocurre en el segmento rojo del ARNm, uno o más EJC se quedarán en su sitio, lo que dispara la degradación del ARNm. De esta manera las moléculas del ARNm son estables únicamente si el primer codón de parada se sitúa dentro del segmento verde. Igualmente, las mutaciones sin sentido en el segmento rojo se detectan y se producen proteínas no truncadas, pero cualquier mutación en la zona verde es capaz de producir directamente una proteína truncada que puede ser patogénica.

Mutaciones que producen sustituciones de aminoácidos

Un cambio de un único nucleótido dentro de una secuencia codificante cambiará un codón por otro. Asumiendo que el codón cambiado no es un codón de parada, hay dos resultados posibles.

- *sustituciones sinónimas* son cambios de un único nucleótido que reemplaza un codón por otro diferente que codifica el mismo aminoácido; por ejemplo, un cambio T>G en el ADN que convierte un codón UUU en el ARNm a UUC. Ambos codifican fenilalanina.
- *mutaciones de cambio de sentido* reemplazan un aminoácido por otro, cambiando un codón. Usar la *Tabla 6.1* para identificar el efecto del un cambio de un codón en la secuencia de un aminoácido.

Es importante recordar, como se mencionó antes, que cambios sinónimos o cambios de sentido aparentemente inocuos pueden tener un efecto patogénico importante por interrupción del *splicing*.

La *Tabla 6.3* en la *Sección 6.4* da una guía general del probable efecto de varios tipos de mutaciones.

6.3. Estudio de pacientes

Aquí consideramos la patología molecular de las mutaciones que ya han sido identificadas, como en la investigación del Caso 15 (Familia O'Reilly).

CASO 1 | Familia Ashton | 1 | 7 | 65 | 104 | **150** | 376

- John, 28 años, hermano de Alfred Ashton
- ? Enfermedad de Huntington
- Otros miembros de la familia con síntomas similares
- El árbol genealógico muestra una herencia autosómica dominante
- Se ordena test diagnóstico

La expansión por repeticiones de trinucleótidos fue descrita en el *Capítulo 4*. Formalmente es una inserción en la secuencia codificante del gen *HD*. El gen mutante es transcrito y traducido. La expansión adiciona tripletes CAG, por lo que no interrumpe el patrón de lectura. La proteína producto normal es la huntingtina, una proteína de 3142 aminoácidos con una cola expandida de glutaminas cerca del final N-terminal (CAG es un codón para la glutamina). Las personas afectadas normalmente son heterocigotas, pero han sido descritos raros homocigotos y son clínicamente indistinguibles de los heterocigotos. Esto sugiere que es la presencia de la proteína mutante, en vez de la ausencia de la proteína normal, la causante de los problemas. Se han descrito pacientes sin la enfermedad de Huntington que tienen deleción, mutación sin sentido u otros cambios en el gen. Además, al menos una persona ha sido descrita sin enfermedad de Huntington a pesar de tener un reordenamiento cromosómico que interrumpe una copia del gen de la enfermedad de Huntington. Unidas, estas observaciones dejan claro que la enfermedad de Huntington puede ser causada por una ganancia de función. La proteína mutante es de alguna manera tóxica para las neuronas, especialmente en el estriado y en el núcleo caudal del cerebro. La muerte celular gradual conduce a una enfermedad de comienzo tardío. Saber exactamente por qué la proteína mutante es tóxica es controvertido. Esta forma agregados dentro de las neuronas, pero no está claro que estos por sí mismos sean perjudiciales. Probablemente un producto intermedio en el proceso de agregación sea tóxico. La proteína normal interactúa con muchas otras proteínas (funciona probablemente como un tipo de andamio para el ensamblaje de complejos multiproteícos) haciendo muy dificultoso identificar la clave que altera la función.

CASO 2 | Familia Brown | 2 | 8 | 65 | 126 | **151** | 279 | 376

- Niña (Joanne) de 6 años de edad, padres David y Pauline
- ? Fibrosis quística
- ¿Ordenar test molecular?
- Definir mutaciones en el gen CFTR

La fibrosis quística es una enfermedad recesiva causada por una pérdida completa de función del canal de cloruro codificado por el gen *CFTR*. Siendo afectada, Joanne no debería tener una copia funcional del gen (lo más importante es que tiene una copia no funcional, en vez de tener dos copias mutantes, aunque normalmente el resultado puede ser el mismo). El test de ADN (*Capítulo 5*) reveló tres cambios en la secuencia: c.368G>A en el exón 3, p.508del en el exón 10 y c.2752-15C>G en el exón 14b producto de PCR. De estas, p.F508del está muy bien estudiada, siendo la más común en europeos con fibrosis quística (ver *Tabla 11.1*). La mutación es una deleción *in-frame* de tres nucleótidos consecutivos en la secuencia codificante. Virtualmente se produce una proteína de tamaño completo con 1479/1480 aminoácidos correctos, pero el aminoácido perdido afecta a la estructura. La proteína mutante no se procesa correctamente después de la síntesis y falla su localización en la membrana de la célula apical donde es necesaria. El resultado es una pérdida completa de función (ver *Tabla 6.4*). Las otras dos mutaciones de Joanne no eran comunes. El cambio en el exón 14b se pensó que no era patogénico por dos razones:

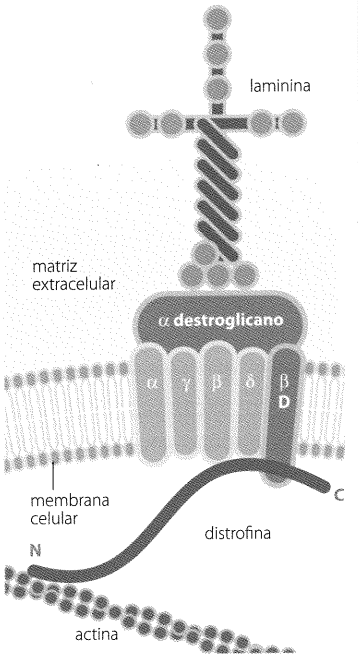
(1) El cambio C>G ocurrió en el intrón 14a, 15 nucleótidos antes del comienzo del exón 14b. A veces, los cambios intrónicos pueden ser patogénicos, afectando al *splicing*. Esta mutación no tiene ningún signo que sugiera que puede haber ocurrido esto, pero sin estudios de ARN un efecto de *splicing* no se puede descartar. Pero en este caso había una segunda evidencia:
(2) Cuando el ADN de los padres de Joanne, David y Pauline, fue estudiado, ambas mutaciones p.F508del y c.2752-15C>G procedían de David. Ambas deben de estar en la misma copia del gen. Incluso, si la mutación c.2752 fue patogénica, no podría explicar la enfermedad de Joanne, porque el gen que heredó de Pauline debería también estar mutado.

La otra mutación de Joanne, c.368G>A, viene de su madre. El cambio en el nucleótido está dentro del exón 3 y convierte el codón para el triptófano 79 (TGC) en un codón de parada (TAG). Sin ninguna duda es un cambio patogénico. Por el degradamiento mediado-sin sentido es poco probable que el gen mutante pudiera producir proteína y, si produjo alguna, podría ser no-funcional, ya que el codón de parada está muy al inicio de la secuencia. Además, una búsqueda en la base de datos de mutaciones en *CFTR* www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ mostró que previamente había sido identificada en otros pacientes de CF.

CASO 4 | Familia Davies | 4 | 10 | 66 | 102 | **151** | 181 | 279 | 376

- Niño (Martin) de 24 meses
- Historia familiar de distrofia muscular
- Árbol genealógico con herencia recesiva ligada al X
- Test diagnóstico de ADN
- Mutación en el gen de la distrofina

Martin tiene una deleción de los exones 44-48 del gen de la distrofina (*Capítulo 4*). La gran molécula de la distrofina dentro de la célula muscular funciona como una cuerda con ganchos en sus extremos (*Figura 6.4*) El cuerpo de la cuerda está formado por unidades de repetición; su número preciso no es crítico para la función de la distrofina. Si Martin simplemente tiene una molécula de distrofina un poco más pequeña de lo normal, debería tener un buen pronóstico. Pero cotejando la longitud del exón en la *Tabla 6.2*, podemos ver que esta deleción



produce un cambio de patrón de lectura. Cualquier proteína producida podría tener una secuencia de aminoácidos completamente errónea más abajo del cambio de patrón de lectura; de hecho, un ribosoma que leyera un mensaje de este nuevo patrón de lectura podría encontrar pronto un codón de parada. Como en el caso anterior, la degradación mediada-sin sentido explica que el gen de Martin pudiera no producir proteína, en vez de una proteína truncada. Estudiando una biopsia muscular con distrofina marcada con anticuerpos, se podría confirmar la ausencia de la proteína distrofina (ver *Figura 1.4*). En el caso de Martin esto no añade nueva información útil, pero en niños donde el cribado de deleciones por PCR no identifica mutaciones, es un valioso test diagnóstico. Buscar en el amplio gen de la distrofina (79 exones, 11 kb de la secuencia codificante, 2.4 Mb de ADN genómico) una mutación puntual puede ser extremadamente laborioso, mientras que una biopsia de músculo proporciona una confirmación más fácil del diagnóstico.

Figura 6.4 – La molécula de distrofina ancla el citoesqueleto de las células musculares a la matriz extracelular, vía complejo glicoproteína distrofina. Incluye los sarcoglicanos (mutaciones que causan distrofia muscular de cinturas) y destroglicanos. Las células musculares que pierden distrofina son frágiles y fallan después de unos pocos años, de ahí la progresiva debilidad muscular.

CASO 6 | Familia Fletcher | 5 | 12 | 67 | 131 | **152** | 376

- Frank, 22 años, con visión borrosa progresiva
- Historia familiar de dificultades visuales
- El árbol familiar sugiere herencia recesiva ligada al X pero no concluyente
- ? LHON
- Se ordena test en sangre para buscar mutaciones en el ADNmt
- Se buscan mutaciones por pirosecuencia
- Mutación G3460 en el ADNmt

La mutación causante fue identificada como G3460A en su ADN mitocondrial (*Capítulo 5*). La mayoría de las proteínas mitocondriales están codificadas por genes nucleares, sintetizadas en los ribosomas citoplasmáticos y después importadas dentro de la mitocondria, pero los genes que codifican las 13 proteínas del ADN mitocondrial son transcritos y traducidos dentro del mitocondrión de forma parecida a como los genes nucleares se expresan. Codifican componentes de la cadena transportadora de electrones de la fosforilación oxidativa.

Las mutaciones mitocondriales pueden ser clasificadas del mismo modo que las nucleares (*Cuadro 6.1*). Las deleciones y duplicaciones grandes son relativamente más comunes, y están ausentes las mutaciones de *splicing* porque los genes mitocondriales no tienen intrones. La heteroplasmia introduce un nivel extra de variabilidad entre genotipo y fenotipo. Las tres mutaciones comunes LHON son mutaciones sin sentido que afectan a tres proteínas diferentes en el sistema de transporte de electrones: p.Ala42Tyr en la proteína ND1, p.Arg340His en ND4 y p.Met64Val en ND6. La mutación de Frank es la primera de estas.

CASO 11 | Familia Kavanagh | 81 | 97 | **152**

- Primer hijo sano
- Segundo hijo, Celia: bajos niveles de hemoglobina
- Anemia falciforme
- Mutación de un único nucleótido, Glu→Val

El único nucleótido cambiado en la secuencia codificante del gen de la β-globina cambia el codón para el aminoácido 6, un codón para el ácido glutámico en otro para la valina (*Figura 6.5*). El efecto de este cambio ha sido estudiado. El ácido glutámico es un aminoácido polar. El grupo carboxilo (-COOH) es ácido en ese lado de la cadena; pierde fácilmente un protón formando un anion (COO).

	Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Ser
NORMAL	GTG	CAT	CTG	ACT	CCT	GAG	GAG	AAG	TCT
FALCIFORME	GTG	CAT	CTG	ACT	CCT	GTG	GAG	AAG	TCT
	Val	His	Leu	Thr	Pro	Val	Glu	Lys	Ser

Figura 6.5 – En la anemia falciforme, una sustitución de un nucleótido A>T reemplaza un ácido glutámico por una valina en la posición 6 de la proteína ß-globina.

Cuando una proteína soluble pliega sus cadenas, las zonas cargadas tienden a localizarse en el exterior de la molécula. La valina es no-polar y se asocia con otros aminoácidos no-polares en el exterior de la proteína plegada, lejos del agua. Tener una valina en la superficie exterior hace que las moléculas mutantes de ß-globina tiendan a pegarse. Los agregados de la proteína resultante distorsionan las células rojas dándoles un aspecto de hoz, causando "agrupamientos" y la subsiguiente isquemia vascular. Así, el cambio de células falciformes puede considerarse una ganancia de función. Sin embargo, podría esperarse que las mutaciones de ganancia de función fueran patogénicas en los heterocigotos, y las personas con el rasgo falciforme son sanas.

CASO 14 — Familia Nicolaides — 115 | 129 | **153** | 376

- ? Portadora de ß-talasemia
- Mutación sin sentido p.GLn39X en Spiros
- Mutación de Elena c.316-106C>G

Spiros tiene la mutación p.GLn39X. Es la clásica mutación sin sentido. Un solo nucleótido sustituido convierte un codón para glutamina (CAG) en un codón de parada (TAG) (*Figura 6.6*). El gen mutante no tiene producto, causando una ß-talasemia en homocigotos.

INTRÓN 1	Leu	Leu	Val	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg	Phe	Phe	Glu
ccaccc**t**tag**G**	CTG	CTG	GTG	GTC	TAC	CCT	TGG	ACC	CAG	AGG	TTC	TTT	GAG
ccaccc**t**tag**G**	CTG	CTG	GTG	GTC	TAC	CCT	TGG	ACC	TAG	AGG	TTC	TTT	GAG
INTRÓN 1	Leu	Leu	Val	Val	Pro	Pro	Trp	Thr	STOP				

Figura 6.6 – La mutación p.Gln39X en el gen de la ß-globina está cerca del inicio del exón 2, convirtiendo un codón glutamina en un codón de parada. Las minúsculas representan intrón; las mayúsculas, exón.

La mutación de Elena (*Figura 6.7*) es más leve. El cambio, c.316-106C>G, es de un solo nucleótido dentro del intrón 2 del gen de la ß-globina, 106 nucleótidos arriba del comienzo del exón 3. Es un ejemplo de una clase de mutaciones que podrían ser solo caracterizadas estudiando ARNm. Estos cambios aparentemente inocuos activan sitios crípticos de corte que preferentemente se usan para comparar con el sitio de corte del donante normal. El resultado es un ß-talasemia; esto es, el gen mutante produce algunas cadenas ß mutantes, empleando el sitio normal de corte, pero no en cantidad suficiente.

La *Tabla 5.2* recoge otras tres mutaciones de ß-globina que son causas comunes de talasemias en grecochipriotas. Curiosamente, las tres afectan al *splicing*.

- La mutación más frecuente, c.93-21G>A, de nuevo activa un sitio de críptico corte en un intrón, esta vez en el intrón 1. El 80% del tiempo

INTRÓN NORMAL 2	c t a a t a g c a g c t a c a a t c c a g c t a c c a t t c t g c t
MUTANTE manejado en parte como exón, con un nuevo sitio de corte donante	C T A A T A G C A G C T A C A A T C C A G g t a c c a t t c t g c t

Figura 6.7 – La mutación c.316>106C>G activa un sitio de corte críptico dentro del intrón 2 del gen de la ß-globina las minúsculas son intrón y los mayúsculas son el exón anormal.

se emplea el nuevo sitio de corte y este alelo produce solo el 20% de la cantidad normal de ß-globina. Para muchos genes un 20% del nivel de función podría ser suficiente, pero la ß-globina se requiere en grandes cantidades, por ello el resultado es una $ß^+$ talasemia.

- La segunda mutación, c.92+6T>C, es un ejemplo de mutación que reduce la eficiencia de un sitio de corte normal. El nucleótido cambiado está en el intrón 1, seis nucleótidos desde el comienzo del intrón (GGCAGgttgg**t**atcaa.., donde la secuencia del exón está en mayúsculas y el nucleótido que está mutado está subrayado). El nucleótido T no es parte de la invariable GT encontrada en el extremo 5′ de todos los intrones, pero forma parte del contexto necesario para que el sitio de corte sea reconocido eficientemente. De nuevo el resultado es una $ß^+$ talasemia.
- La tercera mutación común en grecochipriotas es c.92+1G>A. Esto cambia directamente el obligatorio GT en el exón 1 - intrón 1 sitio de corte a AT. Los transcritos no se cortan correctamente, por tanto, esta mutación produce $ß^0$ talasemia.

CASO 15 | Familia O'Reilly | 141 | **154** | 376

- Historia familiar de miopía y problemas de cadera. Orla tiene una miopía severa, es baja y tiene problemas en la cadera
- ? Síndrome de Stickler
- Mutación por cambio de patrón de lectura en *COL2A1*

La combinación de gran miopía y problemas en las articulaciones que tiene Orla, se hereda de forma autosómica dominante y es característica de personas que tienen una mutación en el colágeno Tipo II (a veces en el colágeno tipo IX). El colágeno es la mayor proteína estructural del cuerpo humano. Juega gran variedad de papeles, principalmente en el tejido conectivo. Hay al menos 19 colágenos humanos diferentes, codificados por al menos 30 genes. El número de genes es mayor que el número de colágenos porque cada colágeno es un trímero de tres cadenas polipeptídicas ovilladas en una triple hélice. El *Cuadro 6.2* muestra cómo se sintetizan los colágenos maduros. Las fibras que forman el colágeno II son la estructura principal de las proteínas del cartílago, y también son importantes en el vítreo del ojo y en el interior del oído. Los problemas del colágeno II son una de las causas de las condrodisplasias.

El colágeno II es un homotrímero de polipéptidos codificados por el gen *COL2A1* en el cromosoma 12q13. El gen tiene 53 exones, de los cuales los exones 8-49 codifican la región triple helicoidal. La mutación de Orla podría estar en cualquier lugar de estos exones. Los cambios fuera de esta región no están asociados con su fenotipo. Dado que los genes del colágeno tienen muchos exones, el cribado de mutaciones es laborioso y esta disponible solo en laboratorios especializados. En el caso de Orla, después de mucho trabajo, la secuenciación de la PCR-amplificada del exón 40 reveló un único nucleótido delecionado. Esto podría

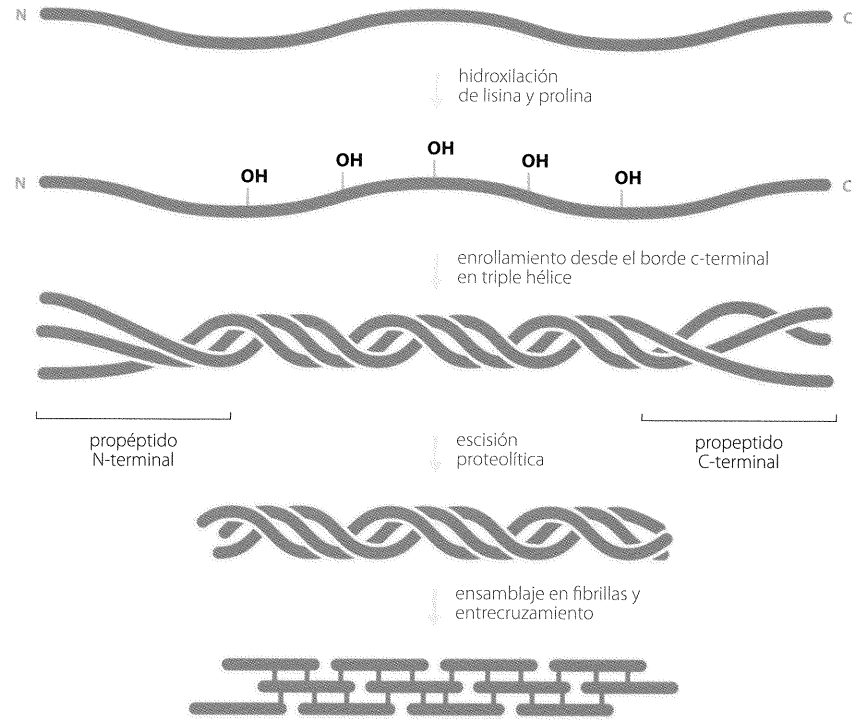
Cuadro 6.2

Biosíntesis del colágeno

Los 30 o más genes del colágeno humano están distribuidos alrededor del genoma. Los colágenos son largas proteínas; el colágeno II que está mutado en **Orla O'Reilly** tiene 1418 aminoácidos. A pesar de tener un gran número de exones (53 para *COL2A1*, 118 para *COL7A1* el gen del colágeno VII) los genes no son particularmente largos (40 kb para *COL2A1*, 32 kb para *COL7A1*). Un hecho inusual es que todos los exones que codifican la parte central de la proteína que formaran la triple hélice son *frame* neutrales. Por ejemplo, en *COL2A1* estos exones son principalmente de 54 o 108 pb, con unos pocos de 45 o 99 pb. Por ello, las deleciones de exones de esta región no producen cambios de patrón de lectura; la proteína es bastante corta.

El producto inicial de la traducción es un preprocolágeno. La futura región triple helicoidal tiene una estructura repetitiva Gly-X-Y, donde X e Y pueden ser cualquier aminoácido, pero con frecuencia son prolina o lisina. Esto produce una modificación extensiva post-transferente.

- En el retículo endoplasmático, una proporción de estas lisinas y prolinas están hidroxiladas por enzimas hidroxilasas especiales que emplean oxígeno, Fe^{2+} y ácido ascórbico como cofactores. Estas modificaciones son esenciales para la maduración del colágeno.
- Los residuos de azúcar son atrapados por algunos de estos grupos hidroxilos.
- Tres cadenas se ovillan entonces juntas, empezando en su extremo C-terminal, para formar una triple hélice. Muchas mutaciones del colágeno interrumpen este proceso, especialmente por sustitución de glicinas con aminoácidos grandes que no se situarán en el interior de la triple hélice.
- Este procolágeno se segrega, después de que unas enzimas especiales partan el C-terminal y N-terminal del propéptido. Muchos colágenos mutantes pierden el sitio de anclaje.
- Finalmente, las moléculas de la triple hélice son ensambladas dentro de un gran multímero y entrecruzadas a través de los residuos de lisina. Algunos colágenos (I,II,III,V y XI) son fibrilares; otros forman mallas que soportan las membranas.



Proceso post-transferente del preprocolágeno II.

causar un cambio en el patrón de lectura, conduciendo a un codón prematuro de terminación o una degradación mediada-sin sentido del ARNm.

Las mutaciones en *COL2A1* causan fenotipos autosómicos dominantes de gravedad variable dependiendo de cómo interfieran con la biogénesis del colágeno. La condrodisplasia *COL2A1* tiene un espectro que va desde la acondrogénesis tipo II, una enfermedad intrauterina o perinatal letal, pasando por la hipocondrogénesis, la displasia espondilo-epifisaria (SED) y la displasia Kniest, hasta el síndrome de Stickler, una enfermedad relativamente leve que se diagnostica tarde. Curiosamente, la mutación con el efecto más drástico en la síntesis de proteínas no es de las que producen los fenotipos más graves.

- Los fenotipos más graves son causados por mutaciones sin sentido que sustituyen las glicinas en la unidad Gly-X-Y del triplete de la región helicoidal. Solo la glicina, el aminoácido más pequeño, puede quedarse en el interior de la triple hélice fuertemente empaquetada, por lo que su sustitución impide el ensamblaje adecuado de la fibrilla. La triple hélice se monta desde el extremo C-terminal, y en general, las sustituciones cerca de este final tienen un efecto más severo que el de posiciones más N-terminales.
- La deleción del exón entero y el salto del exón debido a las mutaciones de *splicing* también se asocian con fenotipos severos. Los heterocigotos intentan combinar cadenas de diferentes longitudes dentro de la triple hélice, lo que de nuevo interrumpe la estructura. Las mutaciones localizadas en los exones 12-24, hacia el N-terminal, tienden a causar displasia de Kniest, que aunque no es letal, se asocia con una estatura muy corta, desprendimiento de retina, sordera y anomalías de las articulaciones.
- Las mutaciones sin sentido y por cambio de patrón de lectura causan el síndrome de Stickler. En un heterocigoto no hay cadenas anormales que interfieran con el montaje de las cadenas normales. El fenotipo, que puede ser variable, con estatura corta, normal o alta, es causado presumiblemente por una deficiencia cuantitativa de colágeno II.

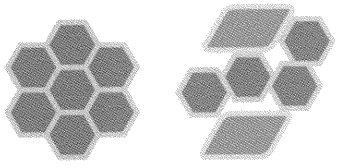


Figura 6.8 – Un efecto negativo dominante. El alelo mutante produce una proteína anormal que interrumpe la construcción de un complejo multiproteico. En los heterocigotos, los alelos dominantes negativos producen fenotipos más graves que los alelos nulos.

Esta serie muestra que es mejor (en un heterocigoto) no hacer proteínas que hacer una que puede interferir con la función de su homóloga normal. La mutaciones se denominan **negativas dominantes** si el producto mutante impide el funcionamiento del producto normal (*Figura 6.8*). Si las moléculas son seleccionadas al azar desde una mezcla 50:50 de cadenas polipeptídicas normales y anormales para su incorporación dentro de la triple hélice, solo una de ocho triples hélices podría constituirse con tres cadenas normales. Diferente a un 50% de triples hélices normales en el caso de un heterocigoto para una mutación nula.

6.4. Resumen y ampliación

La ambición prioritaria de la genética clínica molecular es predecir el efecto fenotípico de cualquier cambio en la secuencia de ADN. Este propósito, establecimiento de correlaciones genotipo-fenotipo, se puede dividir en dos tareas:

- decidiendo cómo afecta una mutación a la función de un gen: ¿produce su pérdida (parcial o total), ganancia, o no tiene efecto?
- decidiendo cómo afectará al fenotipo la pérdida o ganancia de función.

Cambios de pérdidas de función y ganancias de función

La primera cuestión referente a los efectos de una mutación es si ésta causa una pérdida de función o una ganancia de función. Dicho de otra forma, ¿el producto del gen mutado simplemente falla su trabajo normal (parcial o totalmente) o hace algo positivamente perjudicial? La *Tabla 6.3* recoge los efectos probables de los diferentes tipos de mutación.

Muchos de los cambios de la *Tabla 6.3* suprimen probablemente la función del gen. Algunas mutaciones sin sentido y deleciones o duplicaciones en el marco de lectura reducirán, aunque no eliminarán, la función del producto del gen, como las deleciones de los exones en el gen de la distrofina que produce la distrofia

Tabla 6.3 – Tipos comunes de mutaciones y sus probables efectos

Tipo de mutación	Probable efecto en un gen
Gran deleción o inversión	Problablemente eliminará la función completamente.
Duplicación de un gen entero	Aumentará la cantidad de producto en un 50% (de 2 a 3 copias del gen); esto generalmente no tendrá efecto fenotípico, a menos que el nivel preciso del producto del gen sea crítico (dosis-gen sensible): ver por ejemplo Aitman *et al.* (2006)
Cambios en el promotor o secuencia reguladora	Pueden reducir o aumentar el nivel de transcripción, o alterar la respuesta a las señales de control; algunas proteínas producidas tienen la estructura y función normal.
Cambios en el intrón	Lo más probable es que no tenga efectos, pero a veces puede afectar al *splicing*.
Cambios en las regiones no traducidas de 5' o 3' de ARNm	Probablemente no tendrá efectos, pero en algunas ocasiones puede afectar la estabilidad o eficiencia en la traducción del ARNm.
Mutaciones en el *splicing*	La mutaciones de los sitios de *splice* GT...AG probablemente eliminarán la función de este alelo. Otras mutaciones pueden tener efectos más sutiles, causando un número de transcripciones incorrectamente *spliced* o cambiando el patrón de *splicing* alternativo. Un cambio profundo dentro de un intrón puede activar un sitio de *splice* críptico.
Mutaciones de cambio de patrón de lectura	Probablemente para eliminar la función de ese alelo. El polipéptido *downstream* del patrón de lectura no lleva la secuencia correcta para el ensamblaje. Normalmente un codón de parada se encontrará tan pronto como el ribosoma lea los codones con cambio de patrón de lectura. El efecto será el mismo de una mutación sin sentido.
Mutaciones sin sentido	Probablemente para eliminar la función de ese alelo. La mayoría de los ARNm contienen codones de terminación prematuros que no son traducidos y producen una proteína truncada. En cambio, son degradados y no se usan todos *(nonsense mediated ARNm decay)*.
Mutaciones de pérdida de sentido	Efectos muy variables. Podría ser pérdida o ganancia de función, o sin efecto. Reemplazando un aminoácido por otro muy similar químicamente, este tendrá menos efecto que un cambio más radical. Algunos aminoácidos en una proteína son esenciales para su estructura o función, otros no. Mutaciones aparentemente de pérdida de sentido pueden ser patogénicas por un efecto en el *splicing*.
Sustituciones sinónimas	Lo más probable es que no tenga efectos, pero puede afectar al *splicing*.

muscular de Becker (*Tabla 6.2*). Esto es una dificultad para predecir cuándo un efecto de una mutación de perdida de sentido podría tener en una proteína. Muchas sustituciones de aminoácidos afectan a la estabilidad de la estructura 3-dimensional de la proteína, más que alterar un sitio activo u otras partes directamente funcionales de la proteína. Las proteínas suelen estar partidas, glicosiladas, fosforiladas o modificadas de alguna forma después de la síntesis de la cadena polipeptídica básica. Cualquier mutación de pérdida de sentido que reemplaza aminoácidos requeridos para alguno de estos pasos modificantes causarán probablemente una pérdida de función. Pero como se mostró en la *Tabla 6.4*, las mutaciones de pérdida de sentido pueden tener otros efectos.

Tabla 6.4 – Las mutaciones en el gen del canal del cloro *CFTR* reducen o eliminan la función del producto del gen de diferentes maneras. Una pérdida de función en ambas copias del gen conduce a la fibrosis quística.

Clase de mutación	Efecto	Tipo de mutación	Ejemplo
I	No síntesis	Sin sentido, patrón de lectura o *splicing*	p.Gly542X
	Síntesis reducida	Mutaciones que afectan a la eficiencia de un *splicing* correcto	c.3849+10kb C>T
II	Obstrucción procesando una proteína	Pérdida de sentido o deleción del marco	p.F508del
III	No regular correctamente el canal del cloro	Pérdida de sentido	p.Gly551Asp
IV	Conductancia alterada del canal del cloro	Pérdida de sentido	p.Arg117His

Las ganancias de función son menos comunes. Generalmente no hablamos acerca de una ganancia de una función completamente nueva, sino de la función del producto cuando no debería funcionar. Podría convertirse en insensible a las señales que debería inactivarlo, o ser expresado en un alto nivel. El receptor de la superficie de la célula puede llegar a ser constitucionalmente activo, transmitiendo una señal al interior de la célula incluso cuando no está el ligando presente. La enfermedad de Huntington es un ejemplo de una proteína mutante con una ganancia tóxica de función (ver arriba). El mecanismo de ganancia de función requiere del alelo mutante para producir una proteína anormal. Las mutaciones de ganancia de función son, por tanto, mutaciones de pérdida de sentido o mutaciones reguladoras, no sin sentido o mutaciones de cambio de patrón de lectura.

Los cambios que crean genes quiméricos son una clase especial de mutación de ganancia de función. Como se mencionó antes, los reordenamientos cromosómicos algunas veces crean un nuevo gen por yuxtaposición de genes que están normalmente separados en el genoma. Por lo tanto, los genes quiméricos pueden ganar funciones nuevas. Este tipo de exones cambios de lugar han sido probablemente importantes en la evolución; muchas proteínas puede verse que están hechas de combinaciones variables de un limitado repertorio de dominios funcionales, cada uno codificado por exones separados (ver figura en el *Cuadro 3.7*). Debido a que las traslocaciones cromosómicas causan importantes problemas en

la meiosis (*Capítulo 2*), estos reordenamientos raramente son la causa de enfermedades hereditarias. A pesar de todo, el cáncer se desarrolla enteramente por mitosis de células mutantes somáticas, por lo que no es un obstáculo para la propagación de los reordenamientos cromosómicos. Ver *Capítulo 12*.

¿Dominante o recesivo?

Dominancia y recesividad son propiedades de caracteres o fenotipos, no de genes. No deberíamos hablar realmente de "genes dominantes", aunque en ocasiones es complicado no hacerlo. Un carácter es dominante si es visto en un heterocigoto, y recesivo en el caso contrario.

- Las mutaciones por ganancia de función se espera que produzcan caracteres dominantes. La ganancia de función está presente en un heterocigoto, a pesar de la presencia de un alelo normal.
- Las mutaciones por pérdida de función pueden producir caracteres dominantes o recesivos, dependiendo de la sensibilidad del organismo a una pérdida parcial de una función particular (*Figura 6.9*). Para la mayoría de los genes el umbral patológico está por debajo del 50% y las mutaciones por pérdida de función causan fenotipos recesivos. En algunas ocasiones hay **haplo-insuficiencia**, lo que significa que el 50% de la función normal no es suficiente. En este caso, una mutación que cause una pérdida completa de función producirá un fenotipo dominante, porque el alelo normal en un heterocigoto no puede proporcionar una función suficiente por sí mismo.
- Las mutaciones dominantes negativas son una clase especial de mutaciones de pérdida de función, donde el producto normal interfiere con la función del producto normal (ver *Figura 6.8*). Los síndromes de QT largo (*Cuadro de enfermedad 5*) son un ejemplo. Las mutaciones simples de pérdida de función en los genes de los canales de iones producen el síndrome recesivo Romano-Ward: un 50% de la proteína es adecuada para una función normal. El síndrome dominante JLN es el resultado de una mutación dominante negativa en los mismos genes. Un solo alelo mutante produce más del 50% de pérdida de función. Debido a que los efectos dominantes negativos son demasiado perjudiciales, las proteínas de longitud completa pero anormales son particularmente peligrosas para el organismo, lo que proporciona la fuerza que conduce la evolución del mecanismo *non-sense mediated decay*.

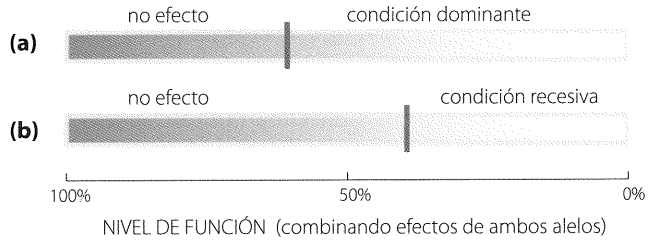


Figura 6.9 – Que una mutación de pérdida de función cause una enfermedad dominante o recesiva dependerá de lo sensible que sea el organismo a dicha pérdida. Si el umbral para una función normal es como se muestra en (a) un heterocigoto con un 50% de función estará afectado y la condición será dominante. Esta situación es llamada haplo-insuficiencia. Si el umbral es como en (b) la condición será recesiva.

Entender el fenotipo

Suele haber un gran abismo entre la acción bioquímica del producto de un gen dentro de una célula y el resultado clínico de la mutación en el gen. Muchos de los casos discutidos a lo largo de este libro ilustran este hecho. Incluso cuando conocemos tanto la bioquímica como el fenotipo es dificultoso explicar cómo el primero conduce al otro. ¿Por qué, un ejemplo entre muchos, la falta de la proteína de unión al ARN debería causar retraso mental, macroorquidismo y una cara larga en hombres con síndrome de X-frágil?

Es importante evitar pensar ingenuamente en "el gen para...". Igual que no debería describir su congelador doméstico como una máquina para arruinar su almacen de comida congelada, no tiene genes "para" fibrosis quística o distrofia muscular. Muchos genes humanos fueron descubiertos a través de estudios de las enfermedades resultantes, por ello es una tendencia natural asignar a una enfermedad el nombre del gen. Puede ser difícil evitar hablar "del gen de la enfermedad de Huntington", etc., pero es importante no ser rígidos pensando que la enfermedad define la función del gen.

Correlaciones genotipo-fenotipo

Establecer con precisión las correlaciones entre las mutaciones y los fenotipos es el santo grial de la patología molecular: altamente deseable, pero rara vez logrado. La mayor parte de la cadena de sucesos entre un cambio en la secuencia del ADN y un problema del paciente es demasiado largo para permitir correlaciones claras. Los genes no actúan en el vacío. El resto de interacciones directas del gen y su producto, el entorno general bioquímico, la historia familiar y el tipo de vida, y simples sucesos del azar, todo conspira para impedir predicciones simples del fenotipo. Las enfermedades mendelianas, que han sido el principal tema de este libro, son simplemente un pequeño subconjunto de todas las enfermedades donde el efecto de un único cambio genético ocurre en algo que está parcialmente sumergido por otros efectos genéticos o ambientales. Incluso las enfermedades mendelianas son rara vez simples cuando se investigan cuidadosamente. Un excelente artículo de Scriver y Waters (1999) disecciona las razones de por qué no existen correlaciones cercanas en una típica enfermedad mendeliana, la fenilcetonuria (ver *Capítulo 8*).

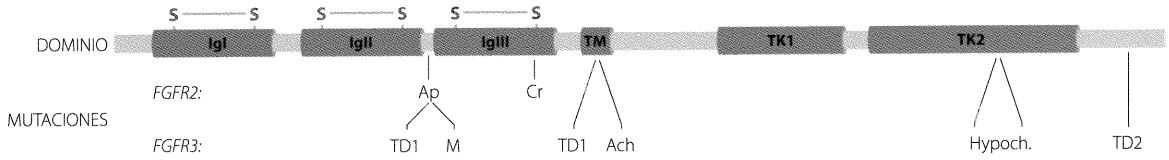
A propósito de esto, las enfermedades donde existe una buena relación genotipo-fenotipo aparecen como una excepción interesante a la norma general.

- Un ejemplo son las hemoglobinopatías. La anemia falciforme y la talasemia eran definidas en términos de producto del gen de la globina, en vez de los efectos de la mutación *downstream*. De este modo, la anemia falciforme es el resultado de una mutación específica p.Glu6Val, y otras mutaciones conducen predeciblemente a una β^0– o β^+-talasemia.
- La mutación de ganancia de función puede producir efectos altamente específicos que no son fácilmente invalidados por otros factores genéticos o ambientales. La expansión $(CAG)_n$ en el gen de la enfermedad de Huntington siempre produce la enfermedad de Huntington, y hay incluso una correlación estadística (aunque no muy

Cuadro 6.3

Correlación genotipo-fenotipo en mutaciones de los genes *FGFR*

Los nueve factores de crecimiento de fibroblastos controlan el crecimiento y la diferenciación de varias células mesenquimales y neuroectodérmicas. Estos actúan a través de cuatro receptores de superficie. Cada receptor consiste en una porción extracelular con tres dominios al estilo de la inmunoglobilina, un segmento transmembrana y una porción interna con dos dominios tirosinas quinasas y una región C-terminal de transactivación (ver figura). En la activación por un ligando, el receptor dimeriza. Esta combinación provoca cambios que activan la tirosina kinasa intracelular. Esto vuelve a activar la señalización Start 1 de las moléculas y finalmente detiene el ciclo celular.



Estructura de un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos y posición de las principales mutaciones. TM, dominio transmembrana; TK dominio Tirosina Kinasa; Ap, síndrome de Apert; Cr, síndrome de Cruzon; TD, displasia tanatofórica; M, craniosinostosis de Muenke; Ach, acondroplasia; Hypoch, hipoacondroplasia.

Cada uno de los cuatro genes *FGFR* codifican, al menos, 12 isoformas de *splice* alternativo. Los receptores pueden tanto heterodimerizar como homodimerizar, y tienen diferentes afinidades por los nueve FGFs. Como resultado pueden mediar en una larga variedad de respuestas sutiles para diferentes de FGFs y en diferentes tipos celulares. Las mutaciones causan ganancia de función. El receptor mutante se vuelve constitucionalmente activo y trasmite su señal, aumentando o disminuyendo su amplitud. Las mutaciones FGFR muestran un genotipo-fenotipo específico remarcable (ver tabla). Casi todas las mutaciones se producen en los genes *FGFR2* y *FGFR3*. Producen un síndrome específico con craniosinostosis y displasia esquelética. Las mutaciones ocurren en la pequeña unión entre el segundo y el tercer dominio de la inmunoglobulina, donde pueden afectar a la flexibilidad de la molécula, y de ahí su potencial dimerización, o en el dominio transmembrana. Cada dominio inmunoglobulina está unido con un puente S–S. Otras mutaciones comunes de pérdida de sentido o eliminan una de las cisternas o crean otra, y esto hace a las moléculas más propensas a dimerizar, incluso en ausencia de ligando.

Fenotipos y mutaciones principales en los genes *FGFR2* y *FGFR3*

Gen	Enfermedad (número del OMIM)	Mutaciones
FGFR2	Síndrome de Apert (101200)	p.Ser252Trp (65%), p.Pro253Arg (34%)
	Síndrome de Crouzon (123500)	p.Cys342Tyr o Arg (50%)
	Beare–Stevenson girata (123790)	p.Ser372Cys (25%), p.Tyr375Cys (75%)
FGFR3	Acondroplasia (100800)	p.Gly380Arg (97%)
	Hipocondroplasia (146000)	p.Asn540Lys (50%), p.Asn540Thr, p.Ile538Val
	Displasia tanatofórica I (187600)	p.Arg248Cys (60%), p.Tyr373Cys (25%)
	Displasia tanatofórica II (187600)	p.Lys650Glu (100%)
	Síndrome de Muenke (ver 134934.0014)	p.Pro250Arg (100%)

predictiva individualmente) entre el tamaño de las repeticiones y la edad de comienzo. Quizás el ejemplo más sorprendente de correlación genotipo-fenotipo exacta en genética clínica es visto con la mutación de ganancia de función en los genes del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (*Cuadro 6.3*).

El concepto **familias sindrómicas** ha sido un modo productivo de explorar las relaciones entre genotipos y fenotipos. Antes de que se conocieron los genes implicados en enfermedades específicas, los clínicos clasificaban las enfermedades por signos y por las investigaciones que estaban entonces disponibles. Los clínicos podrían clasificarse como "disgregadores" o "agrupadores". Los disgregadores se concentraron en las diferencias entre enfermedades y las dividieron en subtipos argumentando que los mecanismos subyacentes podían ser diferentes para los diferentes subtipos. Los agrupadores lo hicieron en las similitudes y clasificaron las enfermedades con signos similares argumentando que deberían tener un único mecanismo subyacente. Esto es lo que hizo en los años ochenta el pediatra alemán J. Spranger para grupos de displasias esqueléticas. Agrupó muchos síndromes con nombres diferentes en un set de síndromes familiares basados en el patrón de conclusiones radiológicas y clínicas, y no en su severidad. Por ejemplo, clasificó la hicondrodisplasia (donde los individuos afectados son enanos y pueden tener serios problemas de articulaciones pero inteligencia normal) junto con la displasia tanatofórica, que es letal al nacimiento por el severo acortamiento de huesos y costillas. Otros síndromes familiares que fueron identificados es la familia Sticker-Kniest (caracterizada por varios grados de acortamiento de huesos de las extremidades, fisura del paladar y miopía severa) y el oto-palato-digital y el Larsen familiar (con deformidades y dislocaciones de las articulaciones y fisura del paladar). Ahora sabemos la base molecular de estas enfermedades y la aproximación de Spranger se considera que ha sido perspicaz. La familia Sticker-Kniest son el resultado de mutación en *COL2A1* (ver Caso 15, familia O'Reilly), mientras que la acondroplasia y los desórdenes asociados son debidos a mutaciones en *FGFR3* (ver *Cuadro 6.3*).

Los estudios del desarrollo normal y la exploración de las correlaciones genotipo-fenotipo en el desarrollo de síndromes han sido beneficiosos para ambos. El beneficio mutuo ocurre de dos formas principales.

- Es frecuente que mutaciones en un gen sean encontradas en la mayoría pero no en todos los pacientes con un particular síndrome de desarrollo, y es lógico buscar la mutación perdida en otros genes implicados. Con frecuencia ocurre que el espectro fenotípico de pacientes con estas nuevas mutaciones es algo diferente del caso original, y esto conduce a clarificar las correlaciones genotipo-fenotipo. Por ejemplo, ver *Cuadros de enfermedad 2* (ATRX), *7* (síndrome de Rett) y *9* (síndrome de Rubinstein Taybi).
- A veces el gen correspondiente a un síndrome es identificado a través de medios puramente genéticos (clonando sin ningún conocimiento previo del producto del gen), la forma de identificación de una vía desconocida hasta el momento. Un ejemplo sería la identificación del efecto subyacente del síndrome X-frágil (ver *Cuadro de enfermedad 4*). Los estudios del ADN identificaron un nuevo mecanismo mutacional, y estudiaron la función de la proteína destacando nuevos aspectos del trasporte de ARNm.

Para más información, ver Donnai y Read (2003), y Brunner y Van Driel (2004).

De forma resumida, la *Tabla 6.5* enumera la extensa correlación genotipo-fenotipo para los casos clínicos tratados a lo largo de este libro.

Tabla 6.5 – Correlaciones genotipo-fenotipo en los casos clínicos tratados

Caso	Enfermedad	Alcance de la correlación genotipo-fenotipo
1	Enfermedad de Huntington	Todos los casos tienen >36 repeticiones de CAG en el gen de la enfermedad de Huntington. El tamaño de las repeticiones están correlacionadas estadísticamente con la edad de inicio. Numerosas repeticiones causan la aparición juvenil de la enfermedad de Huntington, la cual tiene un conocido fenotipo diferente.
2	Fibrosis quística	Pequeña correlación con severidad en pacientes con la clásica fibrosis quística, aunque ciertas mutaciones "leves" se han visto en enfermedades relacionadas, tal como la ausencia congénita de los vasos deferentes, pólipos nasales, etc.
3	Sordera	Considerando la causa más común, en pacientes con mutación 26 en conexina, las mutaciones de pérdida de sentido están asociadas estadísticamente con una menos grave sordera que las mutaciones truncantes, pero la asociación no es previsible para individuos.
4	Distrofia muscular	Las deleciones que cambian el patrón de lectura producen casi siempre distrofia muscular de Duchenne, mientras que las deleciones del marco casi siempre producen la forma suave Becker.
5	Desequilibrio cromosómico	El fenotipo depende del tamaño y del contenido del gen de la región implicada.
6	Neuropatía hereditaria óptica de Leber	Muy pequeña correlación, incluso cuando la heteroplasmia es tomada en cuenta.
7	Deleción 22q11	Pequeña correlación entre el tamaño de la deleción y la severidad del fenotipo.
8	Trisomía 21	El fenotipo es realmente reconocible, pero muy variable. Los casos mosaicos son probablemente menos severos.
9	Síndrome de Turner	Se ha dicho que los problemas de comportamiento dependen de si el único cromosoma es de origen materno o paterno (ver el *Capítulo 7*)
10	Síndrome de Marfan	Una enfermedad variable; pequeña correlación genotipo-fenotipo.
11	Anemia faciforme	Siempre la misma mutación; efectos *downstream* variables.
12	Hemofilia A	La inversión produce severas enfermedades; algunas mutaciones de pérdida de sentido pueden provocar una enfermedad leve.
13	Microduplicación cromosómica	Probablemente las correlaciones serán establecidas; en el presente los casos son insuficientes.
14	Talasemia	Buena correlación entre el tipo de mutación y el fenotipo β^0 o β^+; resultados clínicos modificados por la persistencia de hemoglobina fetal.
15	Síndrome de Sticker	La naturaleza de la mutación *COL2A1* se correlaciona bastante bien con la posición a lo largo del espectro de condrodisplasias.

Predecir el fenotipo: los problemas de nuevos cambios de pérdida de sentido

Los laboratorios diagnostican rutinariamente muchas kilobases de un gen candidato en pacientes con una enfermedad, a la espera de encontrar la mutación causante. Los cambios sin sentido o de patrón de lectura son convincentemente patogénicos pero si un cambio de pérdida de sentido es encontrado, hay un problema de interpretación. ¿Es la causa de la enfermedad del paciente o es una variante inofensiva? Para resolver el problema, son consideradas varias líneas de evidencia:

- ¿El cambio ha sido previsiblemente informado como causante de la enfermedad? Y si es así, ¿hay alguna razón para creer el informe?
- El cambio encontrado ¿está en personas no afectas? Si no está presente en unos pocos cientos de seleccionados no afectos de la misma etnia, como las del origen del caso, entonces al menos no es una variante polimórfica común, pero todavía puede ser una variante rara neutral aún no descrita.
- Si el paciente procede de una larga familia con miembros severamente afectados, ¿está el cambio en todas las personas afectadas? Si no, entonces es poco probable que sea patogénico. A pesar de todo, hasta si es encontrado en todas las personas afectas en la familia, puede ser que la mutación real no haya sido encontrada, y esto es solo una rara variante irrelevante que está en el mismo gen. El cambio c.2752-15C>G en Joanne Brown (Caso 2) podría ser un ejemplo si la verdadera mutación en el mismo gen no ha sido descubierta realmente.
- ¿El aminoácido que es reemplazado tiene un papel fundamental en la función o estructura de la proteína? Raras veces hay el suficiente conocimiento detallado de la proteína que permita una respuesta correcta. Si todas las proteínas relacionadas en humanos y animales tienen los mismos aminoácidos en esa posición (residuos conservados evolutivamente), esto sería evidencia (aunque no prueba) de un papel vital.

Después de que estas líneas de investigación hayan sido agotadas, frecuentemente el laboratorio etiqueta el cambio como una "variante de significado desconocido". Esto resulta, por supuesto, profundamente insatisfactorio para todas las personas implicadas.

Sensibilidad a dosis y patologías de las anomalías cromosómicas

Aunque algunas variantes en el número de copias a gran escala son inofensivas, y pueden incluso ser polimorfismos comunes en la población, la mayoría de los desesequilibrios cromosómicos son patógenos. Presumiblemente la causa es tener un número erróneo de ciertos genes sensibles a la dosificación. Dado que hay una media de alrededor de 1000 genes por cromosoma, hasta un pequeño desequilibrio puede implicar a muchos genes. La mayoría de los genes no son sensibles a la dosificación. Relativamente pocas mutaciones de pérdida de

función producen fenotipos dominantes a través de la haploinsuficiencia, y es todavía menos probable que un aumento del 50% en el número de copias o del nivel de producto pueda causar problemas. Sin embargo, todas las monosomías y trisomías cromosómicas embrionarias son letales o causan importantes anomalías congénitas.

Podemos considerar dos posibles explicaciones:

- En algunos casos, un desequilibrio de dos o tres genes sensibles a la dosificación puede explicar mucha patología. Por ejemplo, los principales problemas del síndrome de Down pueden ser causados por al menos dos genes en el cromosoma 21, *DSCR1* y *DYRK1A*. El producto de estos genes regula ciertos factores de trascripción y, además, afecta indirectamente la expresión de muchos genes. La mayoría de los fenotipos cromosómicos, a pesar de todo, siempre implican más de un gen. Los clínicos pueden reconocer normalmente pacientes "cromosómicos" incluso cuando no pueden pronosticar qué cromosomas están implicados. Sus fenotipos implican múltiples e independientes anomalías del desarrollo y, excepto en casos muy específicos, no son vistos en pacientes con anomalías de un único gen.
- En otros casos el problema puede ser una acumulación de muchos efectos leves. Los genes que codifican proteínas relacionadas funcionalmente están rara vez localizados en el mismo cromosoma. Los componentes individuales de una proteína multicadena como la hemoglobina están codificados normalmente por genes en cromosomas separados. De forma similar, los genes para un factor de transcripción y su diana están con más frecuencia en cromosomas diferentes. No sabemos si esto es el resultado de algún principio que no entendemos, o es solo un ejemplo de la naturaleza aparentemente caótica de nuestro genoma, pero significa que los desequilibrios cromosómicos casi siempre causan desequilibrios en múltiples sistemas que interaccionan. Teniendo el 50% extra de un progenitor en una interacción podría resultar solo un desequilibrio sutil, pero el efecto de las dosis acumulativas de decenas de desequilibrios podría impedir el desarrollo. El hecho es que los pacientes con todas las clases de desequilibrios cromosómicos tienden a tener el mismo espectro de anomalías (retraso mental, retraso en el crecimiento, convulsiones y cara dismórfica), lo que confirma esta visión de la patología.

Es digno de mención que las tres trisomías autosómicas que son compatibles con la supervivencia a término (trisomías 13, 18 y 21) implican cromosomas que son pequeños y relativamente pobres en genes. Estos tres cromosomas tienen 3,50, 4,23 y 5,77 genes por Mb de ADN respectivamente, comparado con la media de todo el genoma de 7,32, de acuerdo con los datos del buscador de genomas ENSEMBL (versión 35, Noviembre de 2005). De forma similar, el bajo número de genes del cromosoma Y ayuda a explicar por qué la mayoría de los hombres 47,XYY están dentro del espectro normal y permanecen sin diagnosticar. A pesar de todo, el cromosoma X lleva gran número de genes, y el hecho de que las personas normales puedan tener uno o dos cromosomas X es inesperado y requiere una explicación especial. Esto es tratado en el capítulo siguiente.

Mutaciones somáticas

Los casos estudiados que han sido revisados en este capítulo tienen todos mutaciones hereditarias implicadas. Pero las mutaciones pueden afectar a cualquier célula y, por ello, la mayoría se producen en células somáticas y no son pasadas. Las mutaciones somáticas son solo un problema en dos circunstancias.

- Si la mutación somática aparece muy pronto en la embriogénesis, la única célula mutante puede dar lugar a un clon sustancial. La persona es un mosaico para la mutación y, entonces, los problemas dependen de qué células están afectadas y de qué mutación se trata.
- Si la mutación causa en la célula somática el que comience a multiplicarse sin control, el resultado debería ser cáncer. Ver *Capítulo 12*.

¿Cómo aparecen las mutaciones?

Las mutaciones aparecen por el daño al ADN o por errores de replicación. El ADN es una molécula bastante estable, pero no es inmune a los cambios químicos. Las bases citosinas son las responsables de desaminarse espontáneamente (las consecuencias son descritas en el capítulo siguiente). El oxígeno reactivo generado por las especies dentro de las células como parte del metabolismo oxidativo normal causa ciertas modificaciones químicas de las bases. Las roturas de las cadenas se producen todo el tiempo como resultado de errores de replicación, cambios químicos o radiación natural. El gran volumen de todos estos daños no está relacionado con la polución industrial, las plantas de energía nuclear u otras actividades humanas. Las células tienen enzimas que son capaces de reparar muchos de los tipos de daño al ADN, aunque la mayoría de estos pasan inadvertidos, pero no son infalibles. Si el daño se limita a una sola cadena de la doble hélice, la complementaria puede ser empleada como modelo para hacer la reparación correcta. Las roturas de doble cadena, a pesar de todo, plantean más problemas y, frecuentemente, el proceso de reparación deja errores en la secuencia.

La replicación del ADN es también un proceso imperfecto. La probabilidad de que la polimerasa incorpore una base mal apareada en la síntesis de la cadena es simplemente una función de relativas uniones de energía en el emparejamiento correcto-incorrecto de las bases. Este cálculo termodinámico sugiere una tasa de error de mayor magnitud que la tasa observada. La alta exactitud es el resultado de la comprobación de la lectura y la detección de los mecanismos de apareamiento erróneo. La polimerasa chequea la cadena de ADN sintetizada buscando bases mal emparejadas. Si se detecta una, la polimerasa retrocede, degrada un pequeño tramo de ADN y lo intenta de nuevo. Curiosamente, cuando fueron diseñados ratones para eliminar la capacidad de lectura de pruebas, pero no la actividad de la polimerasa, una de las ADN polimerasas menores (especializadas en la replicación de ADN mitocondrial) mostró rasgos de aceleración en el envejecimiento (ver Trifunovic *et al.*, 2004). Una de las teorías del envejecimiento lo atribuye a la acumulación de mutaciones. Después de que la polimerasa ha trabajado, unas enzimas especiales eliminan y reparan las bases mal emparejadas en el cercano ADN replicado. En el *Capítulo 12* veremos qué puede pasar cuando falla el mecanismo. A pesar de todo, los

errores persisten. Cadenas de bases idénticas son particularmente responsables de perder o ganar una base por deslizamiento de cadena y mal emparejamiento. La mutación 35delG en el gen *GJB2* (*Figura 6.2*) es un ejemplo. Otras mutaciones pueden ocurrir endógenamente, como por deaminación de citosinas metiladas, y esto es descrito más profundamente en el *Capítulo 7*.

Las mutaciones pueden afectar a cualquier pieza de ADN y en cualquier momento. Nosotros nos hemos centrado en las mutaciones que afectan a la secuencia codificante porque estas son las primeras estudiadas en relación con las enfermedades genéticas, y donde frecuentemente se puede predecir el efecto en el producto del gen. Dado que solo el 1,5% de nuestro ADN es codificante, realmente es un conjunto muy pequeño de todas las mutaciones. La mayoría de las mutaciones en secuencias no codificantes es poco probable que tengan algún efecto fenotípico. Un pequeño número de estas secuencias se conserva entre humanos y otras especies, lo que implica que puedan mutar a lo largo de la evolución sin que los mutantes sufran desventajas selectivas. Sin duda, ciertos cambios son patogénicos, pero en el presente, con muy pocas excepciones, somos incapaces de identificarlos.

Cuadro de enfermedad 6

Patología molecular de las variantes del gen receptor de andrógenos

Los mamíferos, incluidos los humanos, se desarrollan por defecto como mujeres. Es necesaria una cascada específica de eventos para producir machos. El desarrollo normal de la cascada empieza con el gen *SRY* del cromosoma Y. Este hace que las primordiales gónadas indiferenciadas se desarrollen como un testículo. Los testículos segregan la andrógena (hormona sexual masculina) testosterona. Una enzima, el esteroide 5-alfa reductasa, convierte la testosterona en dihidrotestosterona (DHT). La DHT activa el gen receptor de los andrógenos, un receptor esteroide nuclear Clase I. El receptor de andrógenos activado es codificado por el gen *AR* en la zona proximal del brazo largo del cromosoma X en Xq11-q12. El gen tiene ocho exones con 178 kb de ADN genómico y codifican una proteína de 920 aminoácidos. Diferentes mutaciones en estos genes tienen un amplio rango de efectos.

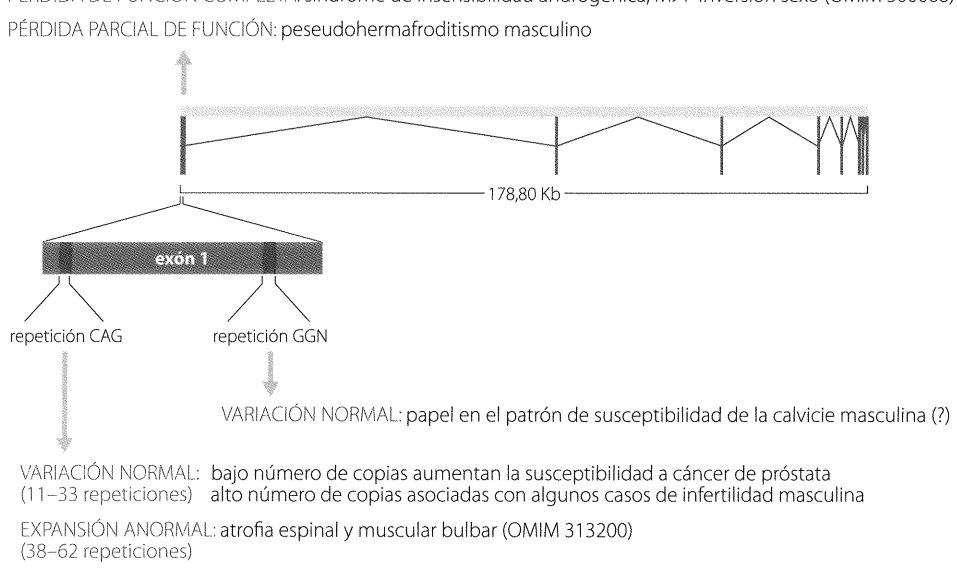
Las mutaciones de pérdida de función producen un síndrome de insensibilidad a los andrógenos ligado al X (OMIM 300068), denominado previamente síndrome de feminización testicular. Los embriones XY desarrollan testículos normales que segregan testosterona de forma normal. Pero si hay una pérdida completa de función del receptor, los tejidos del embrión son incapaces de reaccionar al estímulo de los andrógenos, por lo que el desarrollo anatómico se hace por defecto, siguiendo la línea femenina. Los pacientes tienen un fenotipo femenino, con genitales externos femeninos y desarrollo mamario, pero tienen una vagina ciega en fondo de saco y ausencia de útero. Los testículos son inguinales o abdominales y, a menudo, los pacientes acuden al médico por una presunta hernia inguinal. Es aconsejable extirpar quirúrgicamente los testículos ya que tienen tendencia a malignizar. A parte de esto y su infertilidad inevitable, muchas personas afectas tienen una vida normal.

La pérdida parcial de función del receptor andrógeno puede resultar en una variabilidad de estados sexualmente ambiguos, frecuentemente incluyendo hipospadias y micropenes con ginecomastias (síndrome de Reifenstein; OMIM 312300). Este tipo de pseudohermafroditismo puede tener muchas otras causas. Quizá lo más fascinante de esto es la enfermedad recesiva (PPSH, OMIM 264600) causada por pérdida de función del gen *SRD5A2* que codifica el esteroide 5-alfa reductasa. Siendo incapaz de convertir testosterona en dihidrotestosterona,

los niños afectados tienen genitales ambiguos, pero normalmente son criados como chicas. A pesar de todo, en la pubertad el gen alternativo 5-alfa reductasa, *SRD5A1* dispara una conversión al fenotipo masculino. Los pacientes tienen la voz ronca, les crece la barba y normalmente toman una identidad masculina. Se ha publicado que viven confortablemente con su nueva identidad masculina, por lo que se sugiere que la masculinización temprana del cerebro por la testosterona puede ser, al menos, tan importante como los factores sociales para determinar la identidad sexual de una persona.

La expansión de una repetición $(CAG)_n$ en el exón 1 del gen AR tiene muy aspectos diferentes. La atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA, OMIM 313200) es una de las enfermedades de la familia causada por expansión de repeticiones inestables (ver *Cuadro de enfermedad 4*). Como en la enfermedad de Huntington, la repetición CAG es codificante en la secuencia y codifica un grupo expandido de glutaminas en la proteína receptora. Como en otras enfermedades causadas por colas de poliglutaminas expandidas, hay una ganancia de función: la proteína mutante resulta tóxica para las neuronas. El resultado es una atrofia muscular progresiva ligada al X de comienzo-adulto lentamente progresiva. Además, hay un segundo efecto. Las colas de glutamina expandidas están localizadas en la parte terminal-N de la proteína, que es el dominio de transactivación a través del cual es activado el receptor (unión de andrógeno), estimulando la transcripción de sus genes diana. La expansión de las poliglutaminas disminuye la eficiencia de la transactivación. Los varones con SBMA, por lo tanto, muestran signos leves de deficiencia de andrógenos, en particular ginecomastia.

Las variaciones normales en la repetición $(CAG)_n$ explican las variaciones normales en la respuesta a los andrógenos, pequeñas repeticiones promueven una respuesta fuerte y las largas repeticiones (dentro del rango normal), una débil respuesta. Esto aumenta la incidencia de cáncer de próstata y enfermedades andrógenodependientes. Aunque la distribución se solapa mucho, el tamaño medio de las repeticiones es menor en africoamericanos, intermedio



Diferentes variaciones en el gen *AR* conducen a una amplia variedad de efectos diferentes.
Las mutaciones que causan pérdida o ganancia de función causan distintas enfermedades mendelianas, mientras que una variación normal afecta a la susceptibilidad de muchas enfermedades comunes diferentes no-mendelianas.

Cuadro de enfermedad 6 - *Continuación*

en americanos blancos no hispánicos y mayor en japoneses y chinos. La incidencia del cáncer de próstata varía entre estos grupos en proporción inversa a la media de repeticiones. Las repeticiones en la parte superior del rango normal (>27 repeticiones), por otro lado, se asocian con cuatro veces más de riesgo de infertilidad masculina.

Variaciones en el receptor de andrógenos como un factor de susceptibilidad para la calvicie masculina. Al menos un centenar de genetistas han estudiado la herencia de la calvicie en la mediana edad de los hombres (alopecia andrógenica, OMIM 109200). Una conclusión clara es que, aunque la calvicie puede acumularse en familias, no es un carácter mendeliano simple. A pesar de todo, recientemente se ha comprobado que un importante factor de susceptibilidad se relaciona con algún lugar dentro del locus del receptor de andrógenos. Variaciones en este locus pueden explicar alrededor de la mitad de la susceptibilidad genética. Se desconoce qué variante confiere susceptibilidad, pero un fuerte candidato es la variación en una cadena de glicinas en el exón 1. A diferencia de la poliglutamina descrita antes, esta repetición es variable pero es estable. Una probable razón para la estabilidad es que en el nivel de ADN no es una repetición pura ya que incluye varios codones de glicina diferentes $(GGN)_n$, donde N podría ser cualquier nucleótido. Esta variación reduce el riesgo de deslizamiento durante la replicación de ADN.

6.5. **Referencias**

Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, *et al.* (2006) Copy number polymorphism in *Fcgr3* predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature* **439**: 851–855.

Brunner HG y van Driel MA (2004) From syndrome families to functional genomics. *Nat. Rev. Genet.* **5**: 545–51.

Donnai D y Read AP (2003) How clinicians add to knowledge of development. *Lancet,* **362**: 477–484.

Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW y Kulozik AE (2004) Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nature Genetics,* **36**: 801–808.

Scriver C y Waters PJ (1999) Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet.* **15**: 267–272.

Snead MP y Yates JRW (1999) Clinical and molecular genetics of Stickler syndrome. *J. Med. Genet.* **36**: 353–359.

Trifunovic A *et al.* (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature,* **429**:357–359.

Páginas web útiles

Para más discusiones de la patología molecular ver Strachan y Read (1999) *Genética molecular humana*, Ediciones Omega, S.A. La segunda edición en inglés está disponible gratis como texto de consulta en la biblioteca de NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books

Para la nomenclatura de mutaciones, ver www.hgvs.org/mutnomen/

6.6. Ejercicios de autoevaluación

(1) La fibrosis quística es causada por la ausencia de la membrana celular apical de los canales funcionales de cloro que están codificados por el gen *CFTR*. ¿Cuáles de las siguientes mutaciones puede ser la causa de la fibrosis quística?

(a) Deleción del gen *CFTR*.
(b) Una mutación en el gen codificante de un ARNt arginina-específica causa que la maquinaria de síntesis de proteínas incorpore arginina en la cadena polipeptídica que se está sintetizando como respuesta a los codones de serina. Las sustituciones de argininas por serinas en la proteína CFTR la hacen no-funcional.
(c) Una mutación en el promotor del gen *CFTR* que elimina su habilidad para reclutar a la maquinaria de la ARN polimerasa.
(d) Una mutación en la secuencia codificante del gen CFTR que reemplaza una serina esencial por una arginina no-funcional.
(e) Una mutación en las pequeñas moléculas no codificantes de ARN en el spliceosoma que causa que la maquinaria de *splicing* cree GA...AG como la señal para el comienzo y la terminación de los intrones, en lugar de GT...AG.
(f) Una mutación en el gen de la ARN polimerasa II que hace que la polimerasa sea no-funcional.
(g) Una mutación en la secuencia codificante del gen *CFTR* que causa que el canal de iones trasporte excesiva cantidad de iones cloro.

(2) El *Cuadro 6.4* muestra la secuencia de dos exones (en mayúsculas), flanqueados por secuencias de intrones (en minúsculas), que son amplificados para detección de mutaciones por amplificación con PCR en el gen *PAX3*. Para el exón 1, solo una parte de las 5'UT es incluida en el producto de la PCR. Los nucleótidos son numerados como en el cADN (con el primer nucleótido del codón iniciador numerado +1), y la secuencia de la proteína es mostrada usando claves de una sola letra (ver *Cuadro 3.6*).

En las ocho mutaciones siguientes, se da una secuencia corta que muestra el número del primer nucleótido. El nucleótido cambiado (o el primer nucleótido cambiado si hay muchos cambios) está subrayado. Para cada mutación dar la nomenclatura correcta (a) como un cambio en el ADN (b) (si es necesario) como un cambio en la proteína.

```
c.15   CGGCGCTGTGGCCAGGATGATGC
c.43   GGCCCGGGGTAGAACTACCCGCG
c.78   GCTGGAAGTTAAGGGAGGGCCTC
c.86   TGTCCACTCCACTCGGCCAGGGC
c.121  CTCGGCGGCGTTTTATCAACGGC
c.130  GTTTTGATCAACGGCAGGCCGCT
c.180  CCACAGCGCCCACCACGGCATCC
c.248  TCTCCGAGATCCTGTGCAGGTAC
c.283  TCCATTCCTGGTGCCATCGGCGG
```

(3) En referencia a la secuencia *PAX3* de *Cuadro 6.4*, escribir la secuencia mutante de cada una de las siguientes, formateadas como en el ejercicio 2:
p.N47H
c.247_248ins(C)
c.185_202del
p.E61X
c.85+6G>T
c.86–2A>G
p.V29M

(4) Refiriéndose a la secuencia de *PAX3* del *Cuadro 6.4*, para cada una de las siguientes mutaciones seleccionar una de las ocho opciones de la pág. 172:
(a) Sinónimas
(b) De pérdida de sentido
(c) Sin sentido
(d) Cambio de patrón de lectura
(e) Inserción sin cambio de patrón de lectura/deleción
(f) Mutación *splice-site*
(g) Codón iniciador
(h) Codón terminación
(i) Intrónica

Cuadro 6.4

Secuencia parcial del gen *PAX3* para los ejercicios de autoevaluación

Exón 1 (451 nt)

```
                ..CCGTTTCGC CCTTCACCTG GATATAATTT CCGAGCGAAG TGCCCCCAGG
  1 ATG ACC ACG CTG GCC GGC GCT GTG CCC AGG ATG ATG CGG CCG GGC CCG GGG
  1  M   T   T   L   A   G   A   V   P   R   M   M   R   P   G   P   G
 52 CAG AAC TAC CCG CGT AGC GGG TTC CCG CTG GAA Ggtaagggagg gcctcagcgc..
 18 Q   N   Y   P   R   S   G   F   P   L   E
```

Exón 2

```
                                ..tgacttttcc cttgcttctc tttttcacct tcccacag
 86 TG TCC ACT CCC CTC GGC CAG GGC CGC GTC AAC CAG CTC GGC GGC GTT TTT
 29 V   S   T   P   L   G   Q   G   R   V   N   Q   L   G   G   V   F
136 ATC AAC GGC AGG CCG CTG CCC AAC CAC ATC CGC CAC AAG ATC GTG GAG ATG
 46 I   N   G   R   P   L   P   N   H   I   R   H   K   I   V   E   M
187 GCC CAC CAC GGC ATC CGG CCC TGC GTC ATC TCG CGC CAG CTG CGC GTG TCC
 63 A   H   H   G   I   R   P   C   V   I   S   R   Q   L   R   V   S
238 CAC GGC TGC GTC TCC AAG ATC CTG TGC AGG TAC CAG GAG ACT GGC TCC ATA
 80 H   G   C   V   S   K   I   L   C   R   Y   Q   E   T   G   S   I
289 CGT CCT GGT GCC ATC GGC GGC AGC AAG CCC AAG gtgagcgggc gggccttgcc..
 97 R   P   G   A   I   G   G   S   K   P   K
```

(1) c.85+1G>A
(2) c.86T>A
(3) c.86–18T>G
(4) c.101insGCC
(5) c.118C>T
(6) c.172_173delAA
(7) c.216C>G
(8) c.270C>G

(5) Los efectos de una mutación pueden ser estudiados tanto en el nivel de la proteína como por secuenciación del ADN. Si está disponible el posible anticuerpo, las mutaciones pueden ser clasificadas en CRM^+ y CRM^-. CRM significa material de reacción cruzada. Clasifique cada uno de los tipos de mutación en el *Cuadro 6.1* de este modo, comentando los casos donde el resultado es difícil de predecir.

(6) Un estudiante escribe las siguientes respuestas a la pregunta acerca de la genética de la fibrosis quística:

"El gen de la fibrosis quística es recesivo. Si tiene dos copias del gen, entonces tiene fibrosis quística, pero si solo tiene una copia está igual que alguien que no tenga ninguna copia".

Hacer un comentario al respecto.

Capítulo **7**

¿Qué es la epigenética?

Conceptos y habilidades que aprenderá en este capítulo

Después de estudiar este capítulo será capaz de:

- Definir epigenética, *imprinting*, disomía uniparental e isla CpG.
- Explicar cómo se metila el ADN y cómo pueden ser hereditarios los patrones de metilación.
- Describir dos métodos de estudiar los patrones de metilación.
- Explicar el papel de las secuencias CpG en el control del gen y en la mutación recesiva ligada al X y una traslocación equilibrada X:autosoma.
- Describir la inactivación del cromosoma X y sus consecuencias en los portadores de una enfermedad.
- Dar ejemplos de modelos de árbol genealógico y síndromes esporádicos dependientes del *imprinting*.

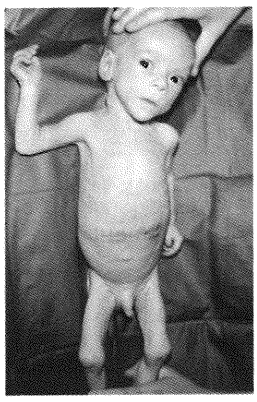
7.1. Historias clínicas

CASO 16 | Familia Portillo | **173** | 183 | 214 | 376

- Pablo, niño enfermizo
- Historia familiar con síntomas similares
- Los análisis sanguíneos sugieren inmunodeficiencia combinada ligada al X

Pilar y Pedro Portillo vienen de familias muy cercanas y las tres generaciones viven en la misma parte de la ciudad. Cuando en 1989 nació Pablo, Pilar y Pedro se alegraron de tener tres hijos, pero Pablo resultó ser un bebé más enfermizo que sus hermanos. Parecía tener siempre resfriados, infecciones de oído o diarrea, de tal manera que no era capaz de ganar peso. La abuela materna de Pilar la animó para que pidieran cita para Pablo con el especialista del hospital infantil, ya que los problemas que este presentaba eran muy similares a los que habían tenido sus dos hijos que murieron antes de cumplir el año. Esperaba que pudiera haber un tratamiento que evitara que Pablo continuara empeorando. En el hospital admitieron a Pablo de inmediato para estudiarlo.

El análisis de sangre mostraba que tenía un recuento de linfocitos muy bajo. No había células T ni NK (*natural killer*); había células B, pero no eran funcionales. En el *Cuadro 7.1* se dan algunos detalles básicos sobre estas células. Estos descubrimientos, junto a la historia familiar, sugerían una inmunodeficiencia combinada ligada al X (SCID-X). Estas eran muy malas noticias porque sin un tratamiento exitoso el pronóstico era muy malo. Los médicos sugirieron que la mejor opción para Pablo era el trasplante de médula ósea (ver *Capítulo 8*).



(a)



(b)

Figura 7.1 – Problemas con la inmunodeficiencia.
(a) Falta de desarrollo y problemas de piel. (b) Se desarrolla herpes simplex sobre un área con eczema (fenómeno Koebner). Foto (a) cortesía del Dep. of Medical illustration, Manchester Royal Infirmary y (b) cortesía del Dr. Andrew Hill, Royal Manchester Children's Hospital.

Cuadro 7.1

Tipos y funciones de los linfocitos

Los tres tipos de linfocitos derivan de la médula ósea; las células B y las NK maduran en la médula, mientras que las T experimentan un proceso de maduración en timo. Las células B dan lugar a las células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas. Las NK son grandes linfocitos granulares con una morfología característica; son más del 15% de los linfocitos sanguíneos y proporcionan una primera línea de defensa frente a las células infectadas por virus. Los **linfocitos T** están implicados en la regulación de la respuesta inmune y la inmunidad mediada por la célula, y ayudan a las células B para que produzcan anticuerpos. Las células T maduras expresan receptores antígenos específicos de células T más la molécula CD3. Además, las células T maduras expresan moléculas de superficie CD4 o CD8 que les permiten jugar un papel en la inmunidad mediada por célula y por anticuerpo (CD4+), o ser citotóxicas (CD8+).

CASO 17 | Familia Qian | **174** | 185 | 376

- Kai, niña, 2 años, tiene retraso del desarrollo
- Convulsiones
- ? Síndrome de Angelman

Chu-Li y Chan son una pareja que trabaja duramente en su negocio de importación. Cuando su primera hija Kai nació, la madre de Chu-Li se trasladó desde Hong Kong para ayudar a cuidar al bebé. Había cuidado a varios nietos antes, pero incluso a ella le pareció muy duro hacer que Kai se alimentara bien, reposara y durmiera. Kai ganaba peso de manera muy lenta y no alcanzaba los percentiles de desarrollo. Parecía muy nerviosa, aunque daba la sensación de ser feliz y se reía mucho. A la edad de 2 años no mostraba signos de aprender a hablar y pidieron cita con el pediatra. Sin embargo, antes de que esta tuviera lugar padeció convulsiones y tuvo que ser ingresada en el hospital infantil.

La pediatra tenía claro que había grandes problemas con su desarrollo. Se dio cuenta de que Kai, que solo había aprendido a andar, lo hacía con las piernas

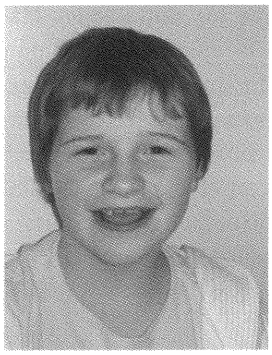


Figura 7.2 – Niña de 10 años con síndrome de Angelman. La niña tiene una mutación en el gen *UBE3A*. Foto cortesía del Dr. Jil Cayton-Smith, St Mary's Hospital, Manchester.

muy separadas. Tenía muchos movimientos espasmódicos, especialmente con las manos. Se reía muchísimo y tendía a sacar la lengua y babear. Sus medidas mostraban que el perímetro cefálico que era normal al nacimiento, ahora se encontraba por debajo del tercer percentil. La pediatra pidió que se realizara un EEG y el resultado confirmó sus sospechas. Había cambios generalizados en el EEG con actividad delta de alta amplitud con picos de onda intermitente y descargas de onda lenta. La pediatra le dijo a los padres que estaba segura de que Kai tenía una enfermedad llamada síndrome de Angelman. La familia sufrió un shock porque sabían que nadie más en la familia tenía problemas. Querían saber qué había causado la enfermedad y si podía suceder de nuevo. La pediatra les dijo que tenía que enviarles al genetista clínico porque había varias causas del síndrome de Angelman y en ocasiones otro hijo de la familia podía estar afecto.

CASO 18 | Familia Rogers | **175** | 185 | 376

- Bebé niño, Robert, nacido de padres mayores
- Hipotonía al nacer; incapaz de mamar
- El análisis genético durante el embarazo mostraba un cariotipo masculino normal
- ? Síndrome Prader-Willi



Figura 7.3 – Un bebé con síndrome de Prader–Willi. Nótese la marcada hipotonía.

Ralph y Rowena Rogers habían estado casados previamente y cada uno tenía un hijo de su anterior matrimonio. Aunque Rowena tenía 38 años cuando se casaron, decidieron intentar tener un bebé, y estuvieron encantados cuando, a los pocos meses, se confirmó el embarazo. Querían hacerse el mayor número de pruebas posibles para estar seguros de que el bebé estaba sano. La amniocentesis (*Capítulo 14*) mostraba un cariotipo masculino normal y las ecografías no evidenciaban ningún problema. Rowena mencionó que no sentía muchos movimientos fetales, pero creyó que se debía al hecho de que estaba muy ocupada. El parto ocurrió el día esperado y fue algo largo, pero nació un niño de 3,2 kg de peso. La familia decidió llamarlo Robert. Cuando lo pusieron al pecho se dieron cuenta de que era incapaz de mamar y el médico se dio cuenta de que tenía hipotonía. El médico trasladó a Ralph y Rowena sus preocupaciones, y dijo que iba a pedir un análisis cromosómico urgente para el síndrome de Down. Rowena le recordó que la amniocentesis mostraba un patrón cromosómico normal, por lo que el médico decidió esperar y ver cómo progresaba Robert. Necesitaba ser alimentado por sonda porque no mamaba bien y tenía una marcada hipotonía troncal. El pediatra habló con el genetista por teléfono y le explicó los problemas de Robert. Sospechando un síndrome de Prader-Willi, el genetista dijo que quería ver a la familia urgentemente en su consulta. En el departamento de genética, la familia Roberts fue vista en la misma consulta que la familia Qian (Caso 17), lo cual era una coincidencia informativa, especialmente para el estudiante de medicina que los atendió porque estaba haciendo su especialización en genética.

7.2. **Antecedentes**

Los cambios epigenéticos son cambios genéticos heredables pero que no dependen de los cambios de secuencia del ADN. Depende de modificaciones del ADN que mantienen igual la secuencia básica de nucleótidos A, G, C y T.

Estas modificaciones son más difíciles de estudiar que las mutaciones clásicas definidas por secuenciación del ADN. El estudio de la epigenética humana se encuentra en su fase inicial. Algunas personas creen que todo un mundo de fenotipos determinados por la epigenética están esperando a ser descubiertos. Por el contrario, otros creen que tienen solo un papel limitado en la herencia de enfermedades, salvo en el cáncer, que será estudiado en el *Capítulo 12*. Aquí se describe la metilación del ADN, que es el mecanismo principal de la modificación epigenética y se dantres casos para ilustrar la inactivación del X y el *imprinting*, que son los eventos epigenéticos más importantes independientes del cáncer.

Compensación de dosis del cromosoma X

El hecho de que personas totalmente normales puedan tener uno o dos cromosomas X requiere una explicación. Que falte una copia o tener una extra de un autosoma que contenga muchos genes puede ser letal. La explicación recae en un mecanismo de compensación de dosis denominado **inactivación del X** o **lionización** (del nombre de su descubridora, la Dra. Mary Lyon).

Al comienzo de la vida embrionaria de todo ser humano (y otros mamíferos), en el estadio de blastocisto, de alguna manera cada célula cuenta su número de cromosomas X. Se inactivan entonces, y de manera permanente, todos los Xs excepto uno. Los cromosomas inactivados permanecen intactos, pero la mayoría de sus genes no se expresan (algunos genes ligados al X escapan a la inactivación general. Es una elección al azar qué X permanece activo en cada célula. Sin embargo, una vez que la elección está hecha, esta es recordada por todas sus células hijas (ver *Figura 7.4*). La inactivación del X es un proceso epigenético: el cambio genético no cambia la secuencia de ADN, pero se hereda desde una célula a sus células hijas. No es heredable en un árbol genealógico. En la línea germinal femenina el X inactivo es reactivado y, sea cual sea el cromosoma X materno que el embrión herede, este X es inicialmente activo.

La inactivación del X está controlada por un gen llamado *XIST* localizado en la parte proximal del brazo largo del cromosoma X en Xq13. *XIST* se expresa solo en el X inactivado. Produce un ARN largo no codificante que cubre al X inactivo; cómo el ARN XIST se coloca a lo largo del X inactivo sin saltar nunca al X activo es algo que aún se desconoce. Esto desencadena un cambio en la conformación de la cromatina que hace que el cromosoma sea heterocromático y silenciar sus genes. En un cariotipo femenino como el de la *Figura 2.9* se distinguen dos cromosomas X, pero esto es debido a que los cromosomas se ven durante la mitosis cuando todos los cromosomas femeninos están altamente condensados e inactivos. Cuando se completa la división celular, todos los cromosomas se descondensan, pero el X inactivado permanece condensado. En las células femeninas puede verse como un punto de cromatina en el borde del núcleo, el corpúsculo de Barr. En el pasado se estudiaban los corpúsculos de Barr para contar el número de cromosomas X (para analizar el sexo en las atletas). Las mujeres normales y los hombres XXY tienen un corpúsculo de Barr por célula; los hombres normales y las mujeres 45,X no tienen ninguno, y las mujeres 47,XXX tienen dos.

La secuencia de 2,6 Mb adyacente al extremo del brazo corto del cromosoma X tiene propiedades especiales. Una secuencia homóloga está en el extremo

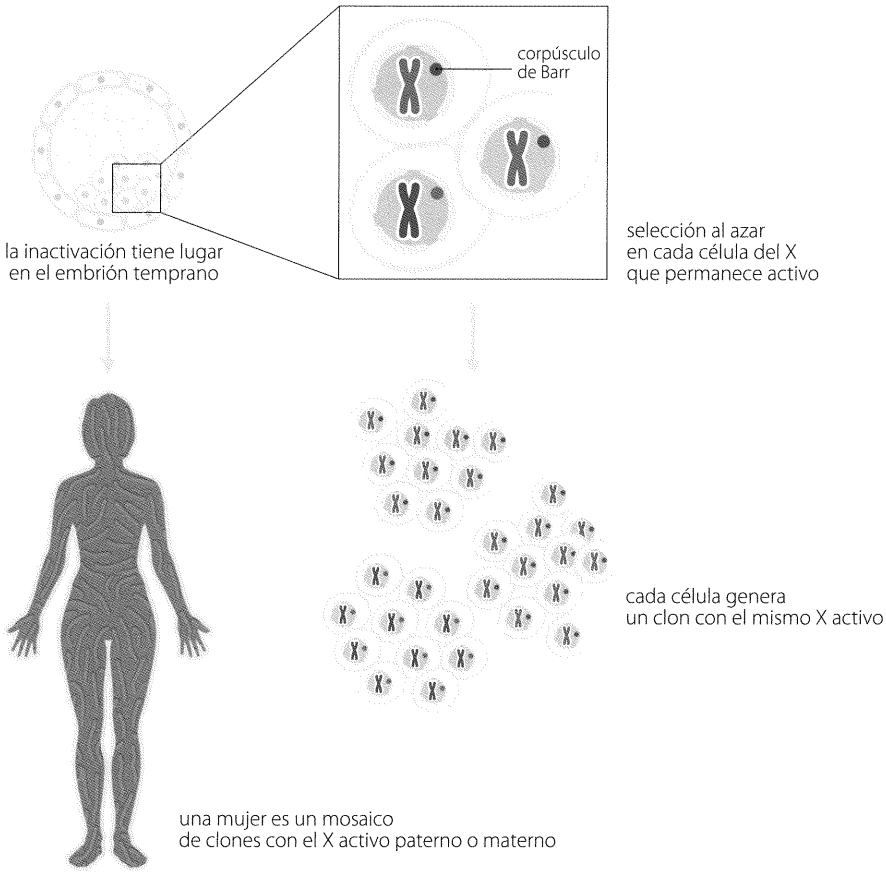


Figura 7.4 – La inactivación del X es un proceso epigenético.
Debido a la inactivación del X cada mujer es un mosaico de líneas celulares con diferentes cromosomas X activos.

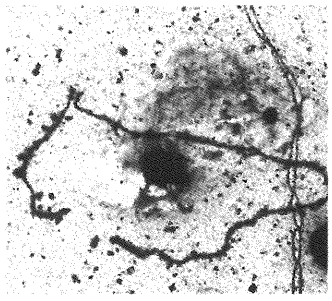


Figura 7.5 – Microfotografía electrónica mostrando los cromosomas X e Y emparejados en profase I de la meiosis a través de la región pseudoautosómica en los extremos de sus brazos cortos. Reproducida de Connor y Ferguson Smith (1991) *Essential Medical Genetics*, 3.ª edición, con todos los permisos de Blackwell Publising, Oxford.

del brazo corto del cromosoma Y; se emparejan en la meiosis (*Figura 7.5*) y tienen un entrecruzamiento obligatorio en esta región. Los genes de esta región escapan a la inactivación del X. Tanto hombres como mujeres tienen dos copias activas de estos genes, y el patrón de herencia de variantes parece autosómico. Por ello esta región se denomina pseudoautosómica. Hay otra pequeña **región pseudoautosómica**, de 300 kb de longitud, en el extremo del brazo largo, pero no se aparea o se entrecruza con su parte homóloga del cromosoma Y en meiosis.

La inactivación del X tiene sus implicaciones para las mujeres portadoras de enfermedades ligadas al X, como se muestra en los casos de las familias Davies y Portillo (Casos 4 y 16), y para las mujeres portadoras de traslocaciones X-autosoma (ver pág. 192). Para ver una explicación más amplia de la inactivación del X, véase el caso de la familia Ingram (Caso 9) de la pág. 182.

Imprinting: por qué se necesita una madre y un padre

Para una persona heterocigota, el origen parental de cada alelo no es relevante cuando se habla de su fenotipo. Pero algunas observaciones sugieren que puede haber algunas diferencias funcionales entre los componentes maternos y paternos en un genoma. En algunos casos los fallos durante la fecundación pueden dar lugar a embriones 46,XX que tienen ambos genomas o maternos o paternos. A pesar de

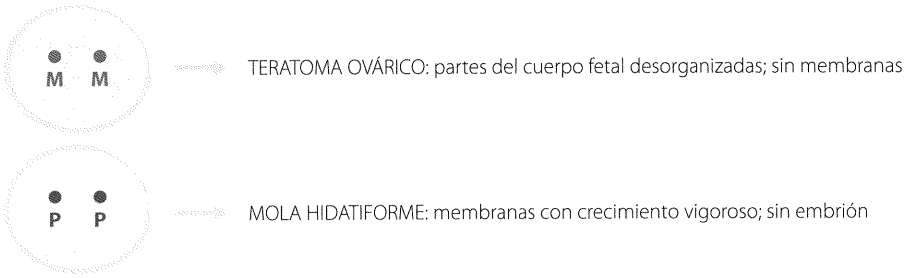


Figura 7.6 – "Embriones" con dos genomas maternos o dos genomas paternos no pueden desarrollarse normalmente.

que son cromosómicamente normales, tales embriones siempre se desarrollan de manera muy anormal y muy diferentes unos de otros (*Figura 7.6*). Los experimentos en ratones lo han demostrado. Evidentemente hay algunas diferencias entre los genomas materno y paterno, y el desarrollo normal requiere uno de cada.

Experimentos más refinados en ratones han permitido estudiar la contribución de cada cromosoma. Ingeniosas manipulaciones permiten generar ratones con un número correcto de cromosomas, pero con ambos cromosomas de un par particular que derivan de un solo progenitor. A este concepto se lo denomina **disomía uniparental** (UPD). Para algunos cromosomas el ratón resultante es normal, pero para otros son anormales, y las anomalías particulares dependen de si el ratón tiene las dos copias de los cromosomas maternos o paternos. Después llegó a ser evidente que ciertos síndromes humanos podían estar causados por UPD.

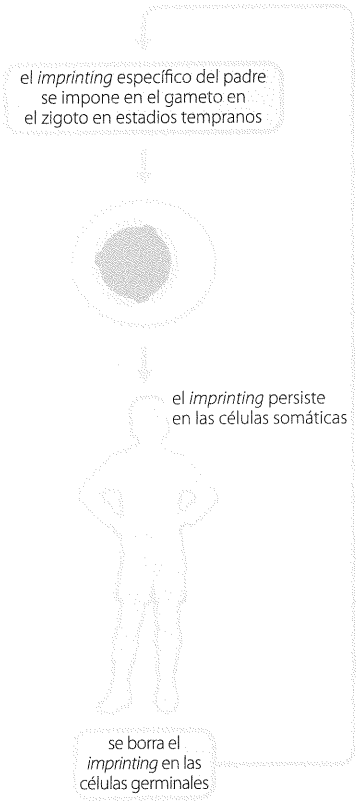


Figura 7.7 – **El *imprinting* es epigenético y reversible.**

Estas y otras observaciones sugieren que hay genes humanos (y en el ratón) que se comportan de manera diferente dependiendo de su origen parental. Deben cargar algún tipo de marcador de "impronta" de origen. Es importante recordar que los genes no son intrínsecamente paternos o maternos. Si un hombre pasa a su hijo un gen con *imprinting* que ha heredado de su madre, lo recibirá con una impronta materna, pero lo pasará con una impronta paterna. Tales improntas deben ser reversibles, así que pueden ser borrados y reactivados en cada generación (*Figura 7.7*). De hecho, el *imprinting* es el mecanismo epigenético más importante: la expresión de genes con *imprinting* se modifica, y la modificación persiste a lo largo de todas las divisiones celulares desde el óvulo fecundado hasta el adulto, pero la secuencia de ADN no cambia. Nuestro conocimiento sobre el *imprinting* en humanos ha experimentado un gran impulso debido al estudio de ciertos síndromes raros, en particular dos enfermedades descritas en los Casos 17 y 18, los síndromes de Angelman y Prader-Willi.

La herramienta para la activación del X y el *imprinting*: la metilación del ADN

En el *Cuadro de enfermedad 2* y en la *Sección 3.4* vimos que la transcripción de un gen está controlada por la estructura local de cromatina. Las dos variantes mayoritarias son la heterocromatina (represiva) y la eucromatina (permisiva). Entre las regiones de eucromatina la expresión génica es controlada por modificaciones en la estructura de cromatina a pequeña escala, gobernados por un repertorio de proteínas unidas a la fibra básica de cromatina. Esto depende de manera alterna en dos señales que interaccionan y se refuerzan mutuamente:

la modificación de las histonas y la metilación del ADN. Las histonas (pequeñas proteínas básicas que componen la parte central de los nucleosomas) están sujetas a un gran número de modificaciones en los aminoácidos de sus colas que les hacen sobresalir del centro de los nucleosomas. Las señales principales son la metilación y la acetilación de residuos de lisina, pero se ven otras modificaciones como la fosforilación, unión de ubiquitina (una pequeña proteína). Todas ellas juntas forman el "código de la histona", que convierte a la fibra de cromatina básica, aparentemente uniforme, en estructuras altamente diferenciadas (Hendrich y Bickmore, 2001).

La metilación se encuentra interactuando con las modificaciones de las histonas. En los humanos y otros mamíferos se lleva a cabo uniendo grupos metilo en posición 5' de las cisteínas para formar 5-metil citosina (5MeC, *Figura 7.8*). La metilación está casi restringida a las cisteínas que unen de manera inmediata el 5′ de guaninas, dando lugar a lo que se ha denominado dinucleótidos CpG (la "p" representa al grupo fosfato que une a los dos). El proceso de metilación del ADN y el de modificación de las histonas 1 son interdependientes. Las histonas modificadas actúan como sitios de anclaje para las proteínas modificadores de ADN, y el ADN metilado se une a proteínas remodeladoras de cromatina. El síndrome de Rett (ver *Cuadro de enfermedad 7*) es el resultado de la pérdida de función en el gen *MECP2* que codifica a la proteína de unión 5MeC. La proteína se une a las regiones metiladas del ADN, donde reprime la actividad del gen, tanto de manera directa como reclutando histonas diacetilasas y otros represores transcripcionales. Para ver detalles e ilustraciones del proceso, Jones y Baylin (2002).

El grupo metilo de la 5-metil citosina se une al surco principal en el exterior de la doble hélice, donde es accesible para las proteínas de unión a ADN, pero sin interferir con el emparejamiento de bases del interior. El 5MeC se empareja con la guanina de la misma manera que la citosina no modificada (*Figura 7.8*), por lo que la metilación CpG no afecta las propiedades codificantes del ADN. No todo el CpG está metilado, y el patrón de metilación es diferente de acuerdo con el tipo de célula y 1 el estado metabólico en el que se encuentre. En general, la metilación suprime la expresión génica, pero hay ejemplos en contra.

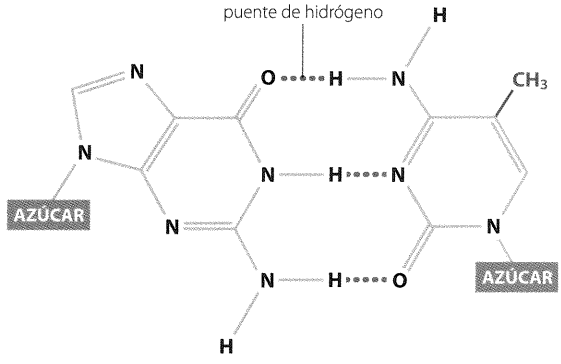


Figura 7.8 – La 5-metil citosina se empareja con una guanina de la misma manera que la citosina no modificada.

La metilación CpG, a su vez, es un mediador clave de la inactivación del X y otros efectos epigenéticos. Es importante para los eventos epigenéticos por el hecho de que los patrones de metilación se pueden heredar. La secuencia CpG es palindrómica. Esto significa que cuando se lee en dirección 5′→3′ una CpG de una ca-

dena de la doble hélice puede ser leída como CpG en la cadena opuesta. Cuando se replica el ADN, una metilasa de mantenimiento metila cualquier CpG de la cadena recién sintetizada que encajan de manera opuesta con las CpG metiladas de la cadena parental (*Figura 7.9*). Así los cambios de metilación CpG proporcionan un mecanismo para producir cambios heredables en la expresión génica que no dependen de los cambios en la secuencia de ADN.

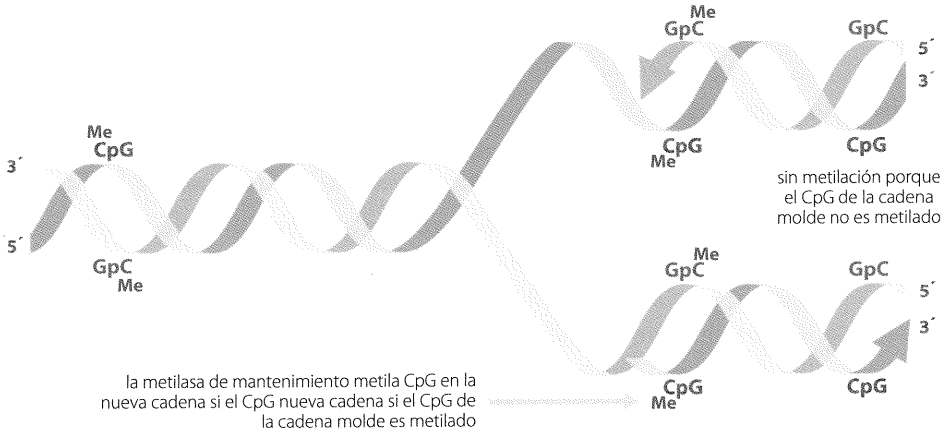


Figura 7.9 – Papel de la 5-metil citosina en epigenética. Cuando se replica el ADN una metilasa específica de mantenimiento metila las secuencias CpG en la cadena que se acaba de sintetizar dondequiera que haya una Cpg en la cadena molde. Como resultado, los patrones de metilación CpG son heredables.

Estudio de la metilación del ADN

Los patrones de metilación en el ADN son mucho más difíciles de estudiar que los cambios de secuencia. Como muestra la *Figura 7.8*, el 5MeC se empareja con una G indistinguible de la citosina no metilada, y se comporta de manera idéntica a la C en la mayoría de los análisis de laboratorio. Las propiedades de hibridación de la cadena de ADN no se ven afectadas por este estado de metilación, por lo que los análisis basados en la hibridación no pueden ser utilizados para estudiar la metilación. La PCR y la secuenciación dependen de hacer copias de una secuencia en estudio e, independientemente del estado de metilación del ADN original, las copias no estarán metiladas. Así, ninguno de los métodos descritos en los *Capítulos 4* y *5* pueden ser utilizados para comprobar el patrón de metilación de una secuencia de ADN. La mayoría de estudios de metilación utilizan dos técnicas:

- *Digestión por enzimas de restricción sensibles a metilación.* Algunas enzimas de restricción cuyo sitio de reconocimiento incluye una secuencia CpG, pueden cortar el sitio solo si no está metilado. Por ejemplo, la enzima de restricción *HpaII* corta secuencias CCGG, pero no puede cortar $C^{Me}CGG$. A otras enzimas no les afecta la metilación; por ejemplo, *MspI* corta CCGG independientemente de su estado de metilación. Esta diferencia puede ser explotada de varias maneras para revelar si un CpG particular está o no metilado. En el estudio de Pablo Portillo (Caso 16, ver más adelante) se amplificó por PCR una secuencia que incluía un sitio CpG; esta secuencia había sido previamente digerida con *HpaII*. Si el sitio no estaba metilado, el molde habría sido cortado en dos, y no se hubiera formado producto de PCR.

- *Secuenciación con bisulfito.* Cuando se trata el ADN con bisulfito sódico bajo condiciones cuidadosamente controladas, la citosina se convierte en uracilo por desaminación, pero el 5MeC es resistente al reactivo. El uracilo no es una base natural en el ADN, pero se empareja con adenina de la misma forma que lo hace la timina. Si un molde tratado con bisulfito es copiado por PCR o utilizado para una reacción de secuenciación, cada C no metilada en la secuencia original aparece como una T, mientras que las Cs metiladas se mantienen como Cs. Si se comparan las secuencias sin tratar y las de bisulfito se revela el patrón de metilación (*Figura 7.10*).

Una variante de este método usa la PCR específica de alelo (*Figura 5.5*) para comprobar el estado de metilación de una C específica. Los cebadores se diseñan con una G o una A como nucleótido del 3′ terminal para que se unan a una C o una U en el molde tratado con bisulfito. El cebador G amplificará solo el molde metilado; el cebador A amplificará solo la secuencia no tratada. Este método funciona mejor si el resto de secuencias con las que el cebador debe hibridar están libres de citosinas metiladas en número variable, de otra manera estas serán muy modificadas por el tratamiento con bisulfito y disminuirán la eficiencia de hibridación del cebador.



Figura 7.10 – Método del bisulfito para analizar la metilación del ADN. El tratamiento con bisulfito convierte las Cs en Us. Las 5MeC se mantienen sin cambios. Tras la amplificación por PCR, las citosinas que estaban metiladas se representan por timinas en el producto de PCR.

7.3. Estudio de pacientes

CASO 4 | Familia Davies | 4 | 10 | 66 | 102 | 151 | **181** | 279 | 376

- Niño (Martin) de 24 meses de edad, padres Judith y Robert
- Torpe y lento deambulando
- Historia familiar de distrofia muscular
- El árbol genealógico muestra herencia recesiva ligada al X
- Análisis diagnóstico de ADN
- Mutación que cambia el patrón de lectura en el gen de la distrofina

Algunas familiares de Martin son portadoras obligatorias o posibles de una enfermedad recesiva ligada al X. Como resultado de la lionización, una mujer adulta normal XX es un mosaico de clones, algunos con un X paterno activo, mientras que otros tienen un X materno activo. Una portadora de una enfermedad ligada al X es un mosaico de clones normales y anormales. Las consecuencias dependen de lo que hagan los genes afectados y de dónde se encuentren las células.

- Cuando el producto del gen es cuantificable o difusible, habrá un efecto promedio. Las portadoras de la hemofilia ligada al X tienen la mitad del nivel normal del factor de coagulación afectado (sujeto a la variación individual normal). Los tiempos de coagulación aumentan, pero la sangre se sigue coagulando lo suficiente como para evitar la enfermedad.

- Cuando el producto del gen es fijo habrá parches de tejido normal y afectado. Esto se demuestra en la displasia ectodérmica anhidrótica (OMIM 305100), en los que la piel afectada no tiene glándulas sudoríparas. El tamaño de los parches depende de si el tejido está compuesto por muchos clones pequeños o por unos pocos grandes, y de cuánta mezcla de células se da lugar durante el desarrollo de ese tejido.
- En la distrofia muscular de Duchenne el escenario es complicado porque las células musculares son multinucleadas. El marcaje de una biopsia de músculo con anticuerpo anti-distrofina muestra una distribución parcheada en los músculos de hembras heterocigotos, reflejando la naturaleza al azar de la inactivación del X (*Figura 7.11*). En ocasiones las portadoras tienen debilidad muscular significativa, debido a que se ha inactivado la mayoría de los X normales en sus células musculares. Se las conoce como **heterocigotas con manifestación.** La mayor parte de las portadoras muestran evidencias bioquímicas de daño muscular subclínico en forma de niveles elevados de creatinina quinasa en suero. Como se mencionó en el *Capítulo 4,* el nivel de CK puede ser utilizado para dar una estimación del riesgo de una mujer de ser portadora, pero es mejor hacer el análisis del ADN.

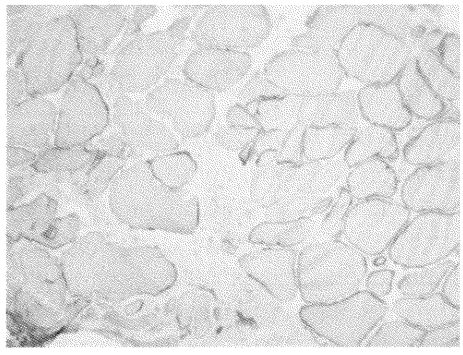


Figura 7.11 – Biopsia de músculo de una mujer portadora de la distrofia muscular de Duchenne marcado con un anticuerpo anti-distrofina.
Nótese la distribución parcheada del marcaje alrededor de las membranas exteriores de las células (comparadas con una sección de un niño afecto o de un control normal, *Figura 1.4*). Foto cortesía del Dr. Richard Charton, Newcastle upon Tyne.

CASO 9 | Familia Ingram | 26 | 41 | 68 | 102 | **182** | 376

- Isabel, primera hija de Ian e Irene
- Talla baja comparada con la estatura de sus padres
- ? Síndrome de Turner
- Diagnóstico confirmado mediante cariotipo

Isabel Ingram solo tiene un cromosoma X, 45,X y tiene síndrome de Turner. Considerando que el mecanismo de inactivación del X existe para permitir el desarrollo normal de personas con distinto número de cromosomas X, uno se puede preguntar por qué tiene una enfermedad. La respuesta es que, incluso descontando las regiones pseudoautosómicas, no todos los genes del cromosoma X son susceptibles de inactivación del X. Una investigación sobre niveles de transcripción globales (Carrel y Willard, 2005) muestra derivaciones sorprendentes del dibujo convencional de la manta de inactivación del X. Incluso fuera de las

regiones pseudoautosómicas, alrededor del 15% de los genes ligados al X escapan parcial o totalmente a la inactivación y un 10% más muestran diferencias entre cromosomas X inactivados en un árbol genealógico de inactivación.

Así, hasta el 25% de los genes ligados al X pueden tener niveles de expresión superiores en mujeres normales que con síndrome de Turner. Aquellos que no tienen una contrapartida funcional ligada al Y tendrán también niveles de expresión de Turner en hombres, pero puede que la mayor expresión de estos genes en las mujeres XX sea responsable de algunas de las diferencias entre hombres y mujeres. Algunos estudios aseguran que las mujeres Turner cuyo X es de origen materno pueden tener problemas de comportamiento del tipo que se ve en niños varones (ese cromosoma X es de origen materno), mientras que las mujeres Turner con X paterno no los tienen. Si es cierto, sería una evidencia de *imprinting*.

CASO 16 | Familia Portillo | 173 | **183** | 214 | 376

- Pablo, niño enfermizo
- Historia familiar con síntomas similares
- El análisis sanguíneo sugiere una inmunodeficiencia severa combinada ligada al X

La inmunodeficiencia severa combinada puede ser una enfermedad tanto autosómica recesiva como ligada al X. En principio puede parecer sorprendente que una inmunodeficiencia pueda estar ligada al X (se puede esperar que las inmunodeficiencias estén causadas por mutaciones en los genes de las inmunoglobulinas, que están localizadas en los cromosomas 2, 14 y 22. Pero la producción de anticuerpos requiere no solo que los genes estructurales de esas proteínas estén intactos, sino también que las células B funcionen correctamente. En el *Capítulo 8* veremos algunos de los complicados procesamientos que se necesitan para permitir que estas células produzcan un repertorio efectivo de infinitas moléculas de anticuerpo. Por otra parte, en la inmunodeficiencia combinada hay una ausencia de células T, así como un defecto funcional que impide que las células B produzcan anticuerpos.

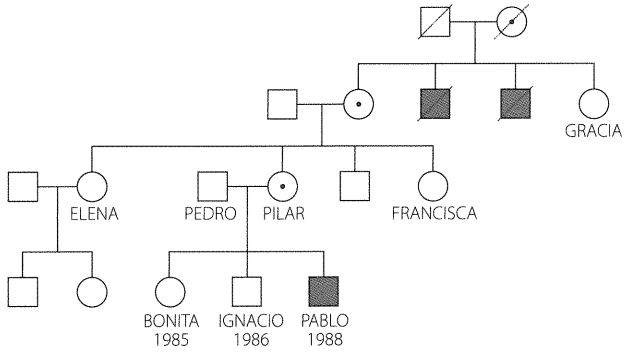


Figura 7.12 – Árbol genealógico de la inmunodeficiencia severa combinada de la familia Portillo.
El patrón muestra que es una forma rara de la enfermedad ligada al X. La madre, la abuela y la bisabuela del probando son portadoras obligadas. Su hermana, sus dos tías y su prima tienen riesgo de ser portadoras.

Cuando se realizó el árbol genealógico (*Figura 7.12*) parecía claro que Pablo tenía una forma de SCID ligada al X. Una de las consecuencias inmediatas para la familia es la de clarificar el riesgo de los parientes. Si tuvieran la forma

autosómica de la enfermedad, cualquiera de los parientes que fueran portadores no tendrían riesgo de tener niños afectos a menos que su pareja fuera a su vez portadora. Debido a que la SCID es muy rara, el riesgo es muy bajo si se casan fuera de la familia. Sin embargo, ahora sabemos que la enfermedad está ligada al X; las hermanas de Pilar, tías e hija tienen un riesgo importante, aunque su hermano e hijo normales tienen un riesgo muy bajo.

Al tiempo que la familia consultaba, no se conocía el gen responsable del defecto del SCID-X. Sin embargo, era posible hacer un análisis de portador mirando el patrón de inactivación del X en mujeres en riesgo. El defecto SCID-X impide el desarrollo de los linfocitos B y T, por lo tanto, todos los linfocitos en las mujeres portadoras deben ser células en las que se inactivó el cromosoma X defectuoso. Las portadoras deben mostrar una inactivación selectiva del X en los linfocitos, aunque en otros tejidos se pueda observar la inactivación al azar del X.

La enzima de restricción sensible a metilación *Hpa*II se utiliza para confirmar la inactivación al azar del X. El receptor de andrógenos del cromosoma X contiene una repetición de trinucleótidos variable $(CAG)_n$ (ver *Cuadro de enfermedad 6*). El análisis solo funciona en mujeres en las que sus dos cromosomas X tengan tamaños de repeticiones diferentes, pero afortunadamente esto es así en la mayoría de mujeres porque las repeticiones son altamente polimórficas. Cerca de la zona repetida hay dos secuencias CCGG que están metiladas en el cromosoma X inactivado de las mujeres, pero que se encuentra sin metilar en el cromosoma X activo (y en el único X de los hombres). Se amplifica por PCR un segmento de ADN que contiene tanto las repeticiones $(CAG)_n$ como los dos sitios CCGG, con o sin digestión previa con *Hpa*II (*Figura 7.13*).

- Cuando se realiza la PCR en una muestra convencional de ADN de mujer, amplifica secuencias de ambos cromosomas X (activo e inactivo). A la PCR no le influye cómo esté metilado el ADN. Asumiendo que la mujer es heterocigota para dos tamaños diferentes de las repeticiones $(CAG)_n$, cuando el producto de la PCR se corra en un secuenciador veremos dos picos del mismo tamaño (*Figura 7.13b*).
- Se realiza una segunda reacción de PCR con una muestra de ADN que ha sido digerida con *Hpa*II. En los cromosomas X inactivos, *HpaII* no es capaz de cortar los sitios de metilación. La secuencia diana de la PCR permanece intacta y puede ser amplificada. En los cromosomas activos, la enzima de restricción destruye la secuencia diana de la PCR. Por lo tanto, los cebadores de la PCR hibridarán con diferentes fragmentos de restricción, y la reacción de PCR no funcionará. El producto de PCR del ADN digerido por *Hpa*II mostrará solo el producto del cromosoma X inactivo.
- Una muestra convencional de ADN contiene ADN de un gran número de linfocitos. Si la inactivación es al azar, más o menos la mitad de las células tendrán un X inactivado y la otra mitad tendrá el otro X inactivado. Cuando el producto de PCR de una muestra de ADN que previamente ha sido digerida con *Hpa*II se corre en un secuenciador, veremos los mismos picos que cuando amplificamos ADN sin digerir, solo que cada pico es más o menos la mitad de tamaño.

- Si la activación del X no se realiza al azar, en el producto de PCR de un ADN predigerido se perderá selectivamente uno de los picos. El secuenciador podrá cuantificar el área relativa de cada pico, y dar una figura precisa de la proporción de células que tienen cada X activado. Una mujer que sea portadora de SCID-X mostrará una pérdida del X inactivado en sus linfocitos.

Este análisis mostraba que Pilar, su hermana Elena y su madre no tenían inactivación al azar del X en sus linfocitos. Un cromosoma que daba un producto de PCR de 270 pb estaba siempre inactivo. Este cromosoma era el que Pilar y Elena habían heredado de su madre. El otro X de Pilar y Elena daba un producto de PCR de 273 pb (la unidad $(CAG)_n$ tendría una unidad más) y se digería totalmente con la enzima *Hpa*II, mostrando que estaba activo en cada linfocito; este procedía de su padre. Francisca tenía un alelo paterno de 273 pb, pero había heredado de su madre un alelo de 285 pb. La digestión con *Hpa*II amplificaba sus dos cromosomas en niveles bastante iguales, mostrando que la inactivación del X de Francisca era al azar. Así, Pilar y Elena (y su madre) eran portadoras de la inmunodeficiencia, mientras que Francisca no lo era. Cuando se realizaban los análisis el gen defectuoso no había sido identificado y, aunque el gen fue mapeado, había cierta incertidumbre sobre los datos. Su historia continuará en el *Capítulo 8*.

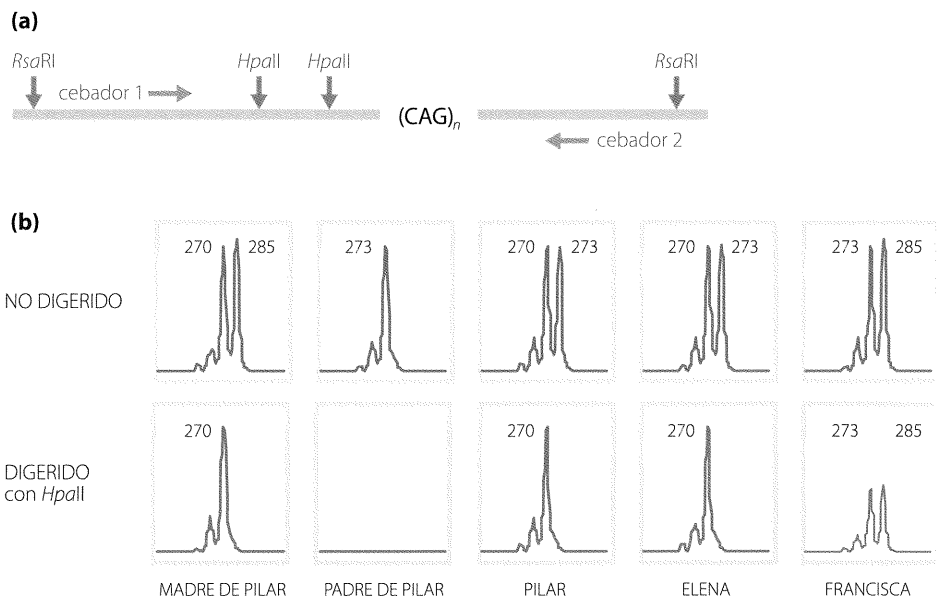


Figura 7.13 – Un análisis para la inactivación al azar del X.
(a) La región del gen del receptor de andrógenos en el cromosoma X utilizado para el análisis. Se muestra la posición de los cebadores de PCR, las repeticiones de trinucleótidos y los sitios de restricción *Hpa*II.
(b) Resultado de los análisis. Los productos de PCR son medidos y cuantificados en un secuenciador de ADN.

CASOS 17 y 18

Familia Qian	174	**185**	376
Familia Rogers	175	**185**	376

Familia Qian
- Kai, niña de 2 años, tiene retraso de desarrollo
- Convulsiones
- ? Síndrome de Angelman
- Comprobar la mutación por FISH

Estos dos casos se discuten de forma conjunta porque, aunque los síntomas del PWS y del síndrome de Angelman son completamente diferentes, las causas de ambas enfermedades tienen muchos puntos en común. Tres de cada cuatro casos de cada síndrome son debidos a la deleción cromosómica 15q11-q13. Es natural suponer que si los dos síndromes son tan diferentes, las deleciones causantes deben estar en distinto nivel molecular, pero no lo están. Las mutaciones están causadas

Familia Rogers
- Bebé niño, Robert, nacido de padres mayores
- Hipotonía al nacer; incapaz de mamar
- El análisis genético durante el embarazo mostraba un cariotipo masculino normal
- ? Síndrome Prader-Willi
- Comprobar por PCR la mutación causativa

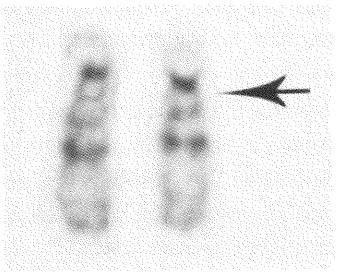


Figura 7.14 – La deleción 15q11q13 de los pacientes con síndrome de Prader-Willi o de Angelman a veces son visibles bajo el microscopio en preparaciones citogenéticas estándar. En la mayoría de los casos se necesita un análisis molecular (FISH o PCR) para realizar el diagnóstico.

por recombinaciones entre repeticiones mal alineadas; el mismo mecanismo que los síndromes de Williams y de Di George-VCFS. En ambas enfermedades se deleciona el mismo trozo de 4 Mb de ADN.

La dificultad para entender estas enfermedades surge cuando se comprueba que las diferencias entre ambos síndromes no va unida a diferencias en el tamaño de la deleción, sino al diferente origen parental de los cromosomas. En el SPW siempre está delecionado el cromosoma 15 paterno, mientras que en el síndrome de Angelman siempre es la copia materna. Así, los genes con *imprinting* en 15q11-q13 son el origen de la patología. Los pacientes de ambos síndromes que no tienen la deleción tienen otras anomalías que afectan a esta región cromosómica (ver más adelante).

Análisis de deleciones por FISH. La deleción solo es visible a veces al microscopio (*Figura 7.14*), pero puede ser comprobada mediante FISH (ver *Sección 4.2*) o MLPA (*Sección 5.2*). Los datos del array CGH que muestra la *Figura 4.8* son de un paciente de PWS. Esta sería una técnica muy cara para comprobar solo la deleción estándar del PWS, pero puede ser apropiada para un caso atípico en el que haya dudas sobre la localización o el tamaño de cualquier deleción. En los dos casos que estamos estudiando, una sonda FISH para 15q11 identificó una deleción en la familia Qian, confirmando el diagnóstico de síndrome de Angelman, pero no se pudo ver ninguna mutación en Robert Rogers y el diagnóstico provisional de PWS necesitaba ser confirmado.

Comprobación por PCR de la presencia de* imprinting *materno y paterno. El PWS siempre se origina por la pérdida de una copia paterna con *imprinting* de la región 15q11q13, pero además de por deleción puede ocurrir de varias maneras. El análisis por PCR puede ser utilizado para comprobar directamente cualquier posible causa que dé lugar al PWS (de manera similar para el síndrome de Angelman). Ciertas secuencias CpG dentro de la región crítica están metiladas de diferente forma en cromosomas que tienen *imprinting* paterno de los que tienen un *imprinting* materno. Esta diferencia puede constituir el *imprinting* funcional actual o puede ser consecuencia de los *imprinting*: ambas opciones para permiten un análisis para comprobar el estatus del *imprinting*. Se trata el ADN con bisulfito para convertir las citosinas sin metilar en uracilos. Los diferentes patrones de metilación paternos y maternos del ADN con *imprinting* protegen a diferentes citosinas del ataque del bisulfito. Así las copias paternas y maternas con *imprinting* de la misma secuencia se convierten por la reacción del bisulfito en secuencias de ADN diferentes. Posteriormente, estas se amplifican por PCR utilizando cebadores específicos de la secuencia bisulfito materna y paterna. Las dos reacciones dan productos de distinto tamaño, de tal forma que pueden ser hechos juntos en el mismo tubo de reacción (*Figura 7.15*).

Utilización de los polimorfismos de ADN para comprobar la disomía uniparental. El análisis por PCR de Robert Rogers mostraba que tenía solo *imprinting* materno, que confirmaba el diagnóstico de PWS incluso cuando no se había encontrado deleción por FISH. Desde que se utiliza el FISH como prueba para comprobar la presencia de una secuencia particular dentro del 15q11q13, el array -CGH podría utilizarse para realizar estudios adicionales, como comprobar secuencias a lo largo de la región candidata PWS en el caso de que tuviera una deleción inusual. En nuestro caso, sin embargo, el siguiente paso fue comprobar la disomía uniparental.

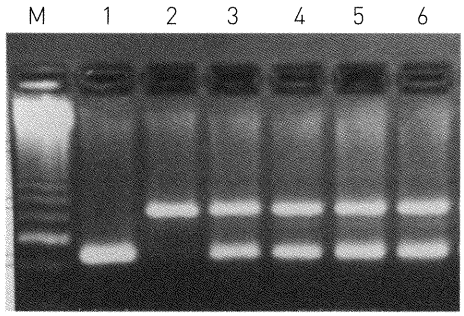


Figura 7.15 – Utilización de la PCR sensible a metilación para diagnosticar el estado de *imprinting* del cromosoma 15q11q13. El cromosoma que lleva el *imprinting* materno da un producto de 313 pb; los que lo tienen paterno dan un producto de 221 pb. Las personas normales muestran ambas bandas (carriles 3-6); los pacientes con síndrome de Angelman pierden el producto de 313 pb (carril 1) y los del síndrome Prader-Willi pierden el de 221 pb (carril 2). El carril M contiene el marcador de tamaños. Para más detalles, Zeschnigk *et al.* (1997). Foto cortesía del Dr. Simon Ramsden, St Mary's Hospital, Manchester.

Aproximadamente el 30% de los pacientes con PWS tienen dos copias intactas del cromosoma 15, pero ambas heredadas de la madre. La disomía uniparental (UPD) puede ser detectada comprobando los patrones de herencia de los polimorfismos en el ADN del cromosoma 15. Hay pequeñas repeticiones en tándem de nucleótidos $(CA)_n$ dispersas a lo largo de todo el ADN no codificante del genoma. El número de unidades CA presente en uno de estos llamados microsatélites a menudo varía entre personas normales. Este número se puede comprobar por amplificación mediante PCR de fragmentos de ADN que incluyan las repeticiones y calculando su tamaño en un gel, de la misma manera que se comprobó el tamaño de las unidades de repetición $(CAG)_n$ en la familia con enfermedad de Huntington (Familia Asthon, Caso 1, vea *Sección 4.3*). Las repeticiones utilizadas en la presente investigación no son patogénicas, pero sirven como marcadores para identificar el origen prenatal de los cromosomas. Para una discusión ampliada de estos polimorfismos de ADN, ver *Capítulo 9.*

La *Figura 7.16* muestra los resultados para dos de los polimorfismos. En el primer caso (*Figura 7.16a*) los alelos estudiados en las tres muestras son tales que no es posible conocer cuál de los dos alelos de Robert viene de cada uno de sus padres. Estos son polimorfismos no patogénicos que no tienen ningún papel en originar el PWS o cualquier otra enfermedad, por lo que son al azar los alelos que tiene una persona. El resultado muestra que Robert tiene dos copias de esta secuencia particular y, como esta secuencia se encuentra dentro de la región crítica del PWS, confirma el análisis de FISH en el que no se observa una deleción. El segundo marcador (*Figura 7.16b*) es más informativo. Vemos que Robert no tiene alelos paternos. Debe ser homocigoto o hemicigoto (una única copia) para el alelo materno; este resultado por sí solo es compatible tanto con la deleción como con UPD. Conociendo que no hay deleción, se demuestra la UPD. Esto es una isodisomía, en la que tiene dos copias del mismo cromosoma materno. La UPD puede ser confirmada encontrando un segundo marcador del cromosoma 15 que tenga un patrón similar (los alelos de microsatélites ocasionalmente mutan, por lo que es prudente confirmar cualquier hallazgo con un segundo microsatélite independiente).

Robert no ha heredado ninguna copia del cromosoma 15 de su padre. Al microscopio, el cariotipo de Robert parece totalmente normal, pero el análisis de microsatélites muestra que ambas copias de sus cromosomas 15 vienen de su madre. El fenotipo de los pacientes del PWS es idéntico al de los pacientes con

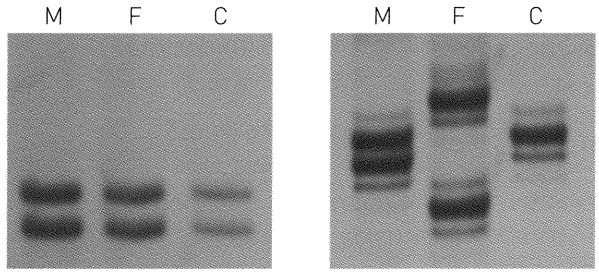


Figura 7.16 – Segregación de marcadores del cromosoma 15 en un niño con síndrome Prader-Willi.
M, madre; F, padre; C, niño. (a) No es posible con este marcador decir qué alelos ha heredado el niño de cada uno de sus padres. (b) Para este marcador el niño no ha heredado ninguno de los alelos de su padre. Foto cortesía del Dr. Simon Ramsden, St Mary's Hospital, Manchester.

UPD o al de aquellos con la deleción paterna más común, mostrando que el PWS está causado por la pérdida de una de las copias de la secuencia 15q11q13 paterna, y tal pérdida de copias de genes paternos en cualquier otra parte del cromosoma 15 no tiene mas efectos. Solo unos pocos casos de síndrome de Angelman sin deleción están originados por UPD; en este caso, teniendo las dos copias paternas y ninguna materna del cromosoma 15.

Los orígenes de la disomía uniparental. La UPD explica por qué Robert tiene PWS, pero ¿cómo se presenta la UPD? Cuando fue publicado el primer ejemplo (un niño con fibrosis quística en 1988) se supuso que en un óvulo, debido a una no disyunción, contenía dos copias del cromosoma implicado y casualmente había sido fertilizado por un espermatozoide, que por no disyunción, no poseía ninguna copia de dicho cromosoma. Si solo se produjera por una coincidencia tan extraña, la UPD sería extremadamente rara. De hecho, dentro de lo poco común, es lo bastante frecuente como para poder ser explicado por unas coincidencias tan raras. Un origen mucho más probable sugiere que viene del rescate de trisomías (*Figura 7.17*). Sabemos que las trisomías ocurren durante la concepción, pero la mayoría de ellas son incompatibles con la supervivencia y desaparecen de manera espontánea. Pero, como muestra la *Figura 7.17*, una no disyunción en una división mitótica temprana de un embrión trisómico puede originar una célula con un número de cromosomas normales. Si esto ocurre lo suficientemente temprano en la embriogénesis, esta célula podría ser capaz de dar lugar a una persona completa. Asumiendo que la no disyunción mitótica se realiza al azar, el resultado será UPD en uno de cada tres. Apoyando esta teoría, la UPD da lugar al 29% de los casos de PWS, pero solo al 1% de los de síndrome de Angelman. Sabemos que las no disyunciones que producen trisomías generalmente ocurren en la meiosis materna, por lo que esperamos que haya más embriones trisómicos que tengan dos cromosomas maternos y uno paterno. Por lo tanto, el rescate de trisomías es más probable que genere UPD maternas que UPD paternas. Puede ser significativo que la madre de Robert, Rowena, tuviera 38 años cuando Robert fue concebido.

Otras causas de PWS y síndrome de Angelman. Las deleciones o las UPD originan prácticamente todos los casos de PWS y la mayoría de los casos de síndrome de Angelman (*Tabla 7.1*), pero algunos tienen otras causas. Tanto el PWS como el síndrome de Angelman son el resultado de la pérdida de función de un gen en la región candidata, cuando tienen lugar mutaciones puntuales de pérdida de función de un gen (en el cromosoma parental apropiado) se puede dar el mismo efecto. La región delecionada contiene un número de genes, algunos



Figura 7.17 – Origen de la disomía uniparental a través del rescate trisómico. El embrión inicial es trisómico. Un evento de no disyunción en la división mitótica genera una célula disómica. Si esto ocurre en el desarrollo temprano, esta célula es capaz de formar un niño completo. Por azar, una de cada tres veces las dos copias serán del mismo progenitor.

de los cuales tienen expresión con *imprinting* (*Figura 7.18*). Al igual que ocurre las regiones con *imprinting*, algunos genes se expresan solo del cromosoma del padre y otros del de la madre. Si se analiza cada gen en busca de mutaciones, se pueden ver algunas puntuales en el gen *UBE3A*, hacia la mitad de los casos de síndrome de Angelman sin deleción y sin UPD. Este gen muestra una expresión con *imprinting* en el cerebro, pero no en otros tejidos; así, el *imprinting* puede ser de tejido específico. No se han descrito mutaciones puntuales para el PWS, seguramente porque el fenotipo está causado por la pérdida de más de un gen.

En algunos otros casos inexplicables de ambos síndromes, parece que hay un fallo en el mecanismo de *imprinting*. Los estudios de marcadores (como en la *Figura 7.16*) muestran que los cromosomas de los dos padres están presentes y completos, pero la PCR específica de metilación (como en la *Figura 7.15*) muestra que ambos tienen el mismo *imprinting* parental.

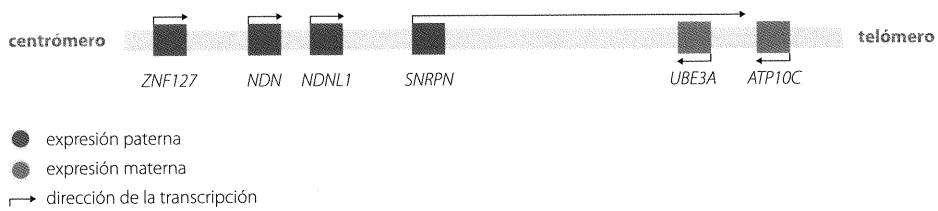


Figura 7.18 – Genes en la región de los síndromes Prader–Willi y Angelman.

Algo ha ido mal con el mecanismo de *imprinting*, ya que ambos cromosomas paternos tienen un *imprinting* materno, causando PWS o viceversa, causando síndrome de Angelman. Estos casos raros son ejemplos de epimutaciones; mutaciones que cambian la epigenética, pero no la secuencia de ADN. Esto puede ser muy valioso para los investigadores que trabajan en los procesos de *imprinting*.

Tabla 7.1 – Causas de los síndromes Prader-Willi y Angelman.

Causa	PWS	AS
Del15(q11q13)	70% (paterna)	75% (materna)
Disomía uniparental	29% (materna)	1% (paterna)
Mutación puntual	–	10% (*UBE3A*)
Error de *imprinting*	1%	3%

7.4. Resumen y ampliación

La CpG como un "punto caliente" de mutaciones

Hemos visto cómo el bisulfito sódico convierte la citosina en uracilo por desaminación (eliminación del grupo amino). Pero en el ADN la citosina también tiende a desaminarse de manera espontánea. Cada día unas 100 células pierden el grupo amino de sus citosinas. Las células tienen una enzima que reconoce al uracilo en el ADN y repara el daño reemplazando el uracilo por citosina. La 5-metil citosina también desamina de manera espontánea. La desaminación de la 5-metil citosina produce timina (*Figura 7.19*), que es un componente natural de ADN, por lo que el cambio no es siempre obvio y se repara. Así, los dinucleótidos CpG poseen una tendencia natural a mutar a TpG. Una revisión a las bases de datos que han sido establecidas para muchas enfermedades muestran que las secuencias CpG son "puntos calientes" de mutación.

La mutabilidad de las secuencias CpG tiene una consecuencia evolutiva. El 41% de las bases del genoma humano son C o G, por lo pude ser que el 4,2% (0,205 x 0,205) de todos los dinucleótidos sean CpG. La frecuencia observada es un quinto

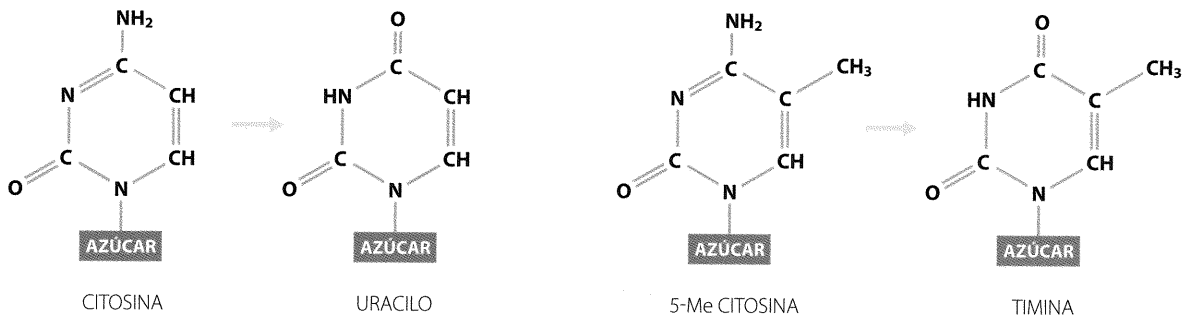


Figura 7.19 – La desaminación de la citosina produce uracilo, una base no natural del ADN, pero la desaminación de la 5-metil citosina produce timina.

de esto. En su conjunto el ADN humano está deplecionado de secuencias CpG; estas han sido metiladas y, a través de la evolución, convertidas por desaminación en TpG. Sin embargo, dispersas a lo largo del genoma hay alrededor de 27.000 de las llamadas islas CpG (el número exacto depende de cómo se defina una isla). Estas islas CpG son estiramientos de ADN, normalmente de 1 kb (o más pequeñas) de tamaño, donde no se han perdido las secuencias CpG. Esto se debería a que estas secuencias no están metiladas o a que son funcionalmente importantes y la selección natural evita que se pierdan.

Alrededor del 50% de los genes humanos tienen islas CpG cerca o dentro de la región del promotor. La regulación de la transcripción puede ser diferente en aquellos genes que tienen islas CpG de aquellos que no las tengan. Las islas CpG normalmente no están metiladas, sin importar si el gen asociado está activado o no. Se metilan de manera anormal en algunas células cancerosas (ver *Capítulo 14*), pero no en células normales. Los promotores que no tienen islas CpG contienen dinucleótidos CpG individuales, y su metilación reversible es parte importante de la regulación génica.

La inactivación del X tiene implicaciones en mujeres portadoras de una traslocación X:autosoma

Pueden darse traslocaciones entre los cromosomas X y un autosoma, de la misma manera que entre otros dos cromosomas cualesquiera. Una mujer que porte una traslocación balanceada X:autosoma necesita inactivar uno de sus dos cromosomas X, de la misma manera que cualquier mujer. Como siempre, en cada célula del embrión se elige al azar uno de los dos cromosomas X y se inactiva. Si se elige para la inactivación el cromosoma X estructuralmente intacto, todo irá bien. Sin embargo, cualquier célula que elija inactivar el X traslocado tendrá problemas. El proceso de inactivación comienza en el centro de inactivación del X, en la parte proximal del brazo largo, y se mueve a lo largo de todo el cromosoma. Desde el centro de inactivación no será capaz de alcanzar la parte del cromosoma X que ha sido separada por la traslocación. Por lo tanto, esta porción separada del cromosoma se mantendrá activa. Como resultado, la célula tendrá dos copias activas de todos los genes de los cromosomas X distales al punto de rotura de la traslocación. Además, como la onda de inactivación se mueve a lo largo del cromosoma puede que no pare exactamente en la unión X:autosoma. En algunos casos los genes autosómicos cerca de la unión pueden ser desactivados también. El resultado general creará desequilibrios genéticos en las células de un embrión que normalmente serán lo bastante graves como para evitar que pueda continuar el desarrollo (*Figura 7.20*). Así, a medida que el embrión se desarrolle, todos los tejidos estarán formados por células que fueron capaces de inactivar su X estructuralmente intacto.

Una mujer que porte una traslocación X:autosoma muestra una inactivación del X selectiva. Esto puede no tener importancia, pero en algunos casos sí la tiene. Cualquier gen mutado que esté en su cromosoma X traslocado afectará a su fenotipo como afectaría a un hombre, debido a que este es el único cromosoma X activo en todas las células de su cuerpo. De igual forma, si el punto de rotura de la traslocación interrumpe un gen, la mujer mostrará el fenotipo completo correspondiente a la pérdida de función de ese gen en un hombre. Por ejemplo,

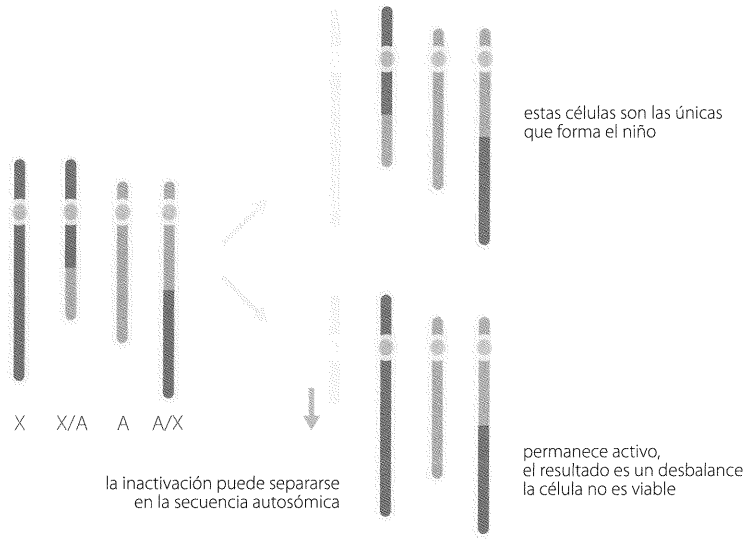


Figura 7.20 – Efecto de la inactivación del X en un embrión con una traslocación equilibrada X:autosoma.

en todo el mundo se conoce unas pocas mujeres no relacionadas entre sí que tienen distrofia muscular de Duchenne severa sin tener historia familiar de la enfermedad. Cada una de ellas posee una traslocación X:autosoma. Cada traslocación implica a puntos de rotura diferentes en el autosoma, pero en cada caso la rotura en el cromosoma X es en Xp21 e interrumpe el gen de la distrofina.

Otras enfermedades relacionadas con el *imprinting*

El estudio de las enfermedades relacionadas con el *imprinting* nos lleva a una de las áreas de la genética humana menos conocidas, y la explicación está lejos del alcance de este libro. Además del 15q11q13, se conocen algunas otras regiones cromosómicas que contienen genes con *imprinting* (*Tabla 7.2*). Como en la región Prader-Willi/Angelman, normalmente contienen grupos de genes que han sufrido *imprinting*, algunos expresados solo del cromosoma materno y otros, solo del paterno. En los síndromes de PWS y Angelman la pérdida del cromosoma materno o del paterno da lugar al síndrome, mientras que si se tienen dos copias de cualquiera de los cromosomas parece no tener ninguna diferencia con el síndrome (porque los casos de UPD son fenotípicamente iguales a los casos de deleción). Otras regiones con *imprinting* pueden mostrar solo efectos con la pérdida de un material cromosómico de un progenitor, o puede mostrar efectos debidos a la dosis al tener dos copias de un cromosoma de uno de los progenitores. En todos los casos, varios eventos diferentes pueden causar la misma enfermedad, como en la *Tabla 7.1*.

¿Qué propósito tiene el *imprinting*?

Se han propuesto varias teorías para explicar por qué se ha desarrollado el *imprinting* (ver Wilkins y Haig, 2003). La conflictiva teoría del *imprinting* sugiere que, dicho en términos del "gen egoísta", los padres tienen un conflicto de intereses. Los genes paternos se propagarán mejor cuantos más hijos se tengan. Si su pareja muere de agotamiento, siempre puede robar a otra mujer de una cueva cercana. Los genes de las mujeres se propagan mejor si se cuida y

Tabla 7.2 – Algunas enfermedades que pueden implicar mecanismos relacionados con *imprinting*

Síndrome	N.º OMIM	Localización cromosómica	Gen afectado
Síndrome de Prader-Willi	176270 (PWS)	15q11q13	*SNRPN* (PWS);
Síndrome de Angelman	105830 (AS)		*UBE3A* (AS)
Síndrome de Beckwith-Widemann	130650	11p15.5	*H19, IGF2, KCNQ1OT1*
Síndrome de Silver-Russell	180860	7p11.2 11p15.5	*GRB10*? *H19, IGF2*?
Tumores carotideos	168000	11q23	*SDHD*
Pseudohipotiroidismo	103580	20q13.2	*GNAS1*
Diabetes mellitus neonatal transitoria	601410	6q24	*ZAC/HYMAI*

no dedica demasiados recursos a un solo hijo. Así, los genes paternos promueven el desarrollo fetal, incluso a expensas de la madre, mientras que los genes maternos limitan los recursos que el feto puede tomar de ella. Esto encaja con las observaciones de la mola hidatiforme y los teratomas ováricos: los genes paternos promueven la proliferación de la placenta y las membranas, que extraen nutrientes de la madre; los genes maternos hacen lo contrario. De todas formas, no todos los fenotipos de *imprinting* encajan en esta teoría; así, se espera que los bebés con PWS sean pequeños y que aquellos con síndrome de Angelman sean grandes, y no es el caso. El *imprinting* del gen IGF2 (factor de crecimiento parecido a insulina de tipo 2) varía entre individuos sanos, sugiriendo que no todo el *imprinting* tiene una función. En algunos casos puede ser un efecto secundario de los mecanismos de control génico.

¿Qué importancia tienen los efectos epigenéticos?

La metilación del ADN celular y los cambios concomitantes en el código de la histona y la estructura de la cromatina son fundamentales para la regulación génica. Dada la naturaleza heredable de la metilación CpG, es razonable suponer que los cambios epigenéticos basados en la metilación del ADN son importantes para el establecimiento y mantenimiento de la identidad de células y tejidos. Esto se sustenta en la investigación del cáncer. Como veremos en el *Capítulo 12*, los cambios epigenéticos son extensos e importantes en el cáncer. Sin embargo, el *imprinting* parece que está limitado a un pequeño número de genes; actualmente apenas una docena.

Un área donde el programa de la epigénetica es importante es en tecnología reproductiva (Horsthemke y Ludwig, 2005). Cuando se clona mamíferos, no suelen ser normales. Aparte del bajo índice de éxito del la clonación (unos pocos óvulos manipulados se desarrollan a término), cuando nace un animal clonado suele ser de gran tamaño y la tasa de muerte neonatal es muy elevada. Se cree que el núcleo de la célula somática usado para la clonación ha experimentado cambios

Síndrome de Rett

El síndrome de Rett (OMIM 312750) es una enfermedad que se desarrolla durante la infancia y afecta casi exclusivamente a niñas. El Dr. Andreas Rett, un médico austriaco, describió por primera vez este síndrome en 1966. Normalmente hay un periodo temprano de desarrollo normal seguido, entre los 6 y 18 meses, de una aparente regresión con pérdida de habilidad en las manos y el inicio del característico frotamiento de las manos y de otros movimientos típicos. La cabeza crece despacio y hacia el 50% desarrolla convulsiones. Son habituales las alteraciones respiratorias, incluidas la hiperventilación y la apnea, y el contacto visual es difícil de percibir. El curso, gravedad y edad de inicio de la enfermedad varían en cada niño. Algunas niñas nunca aprenden a andar o a hablar, mientras que otras conservan estas habilidades hasta cierto grado. La enfermedad puede mantenerse estacionaria durante muchos años, aunque se producen complicaciones como la escoliosis. En los últimos años de vida el aumento del deterioro se debe a la pérdida de masa muscular, a la limitación de la movilidad y a las infecciones pulmonares.



Una niña con sindrome de Rett, mostrando el característico frotamiento de las manos.

La mayor parte de los casos de síndrome de Rett son mujeres y es el único caso en una familia. Sin embargo, existen algunas familias con hermanas afectas, o de hermanastras de la misma madre, lo que sustenta la hipótesis de que el síndrome de Rett está causado por una mutación de un gen del cromosoma X y que parece que es letal en hombres. Se han descrito mutaciones en la proteína de unión metil-CpG 2 (*MECP2*) en estas familias y en la gran mayoría de niñas con síndrome de Rett clásico. Se han descrito mutaciones en *MECP2* en niños con encefalopatía neonatal severa y, de hecho, en algunas familias con una niña con síndrome de Rett, había niños con encefalopatía.

La funciones de la proteína MeCP2 como silenciador transcripcional y regulador epigenético del ADN metilado han sido descritas anteriormente. Parece existir una correlación genotipo-fenotipo, observándose enfermedad más leve en aquellos que tienen una mutación sin sentido que en los que tienen mutaciones que truncan la proteína y en aquellos cuya mutación afecta al sitio de unión. Sin embargo, han sido publicados algunos individuos que tienen la misma mutación pero fenotipos distintos. Por lo tanto, otros factores como la inactivación del cromosoma X pueden influir en la severidad. Los genes regulados por la actividad de la MeCP2 no se han identificado por el momento. Se desconoce también porque puede haber un periodo de desarrollo normal.

Se han descrito fenotipos atípicos con inicio temprano o tardío, o con efectos más leves o más graves y solo un tercio de ellos tienen una mutación en *MECP2*. Algunos de los que tienen inicio temprano tienen espasmos infantiles y fenotipos severos, pero no presentan mutaciones el *MECP2*; en su lugar tienen mutaciones sin sentido de novo en otro gen del cromosoma X, el *CDKL5*. Se ha especulado que la proteína CDKL5 puede estar implicada en la regulación de la fosforilación de MeCP2. Este es un ejemplo de cómo utilizar un fenotipo para desvelar la vía de desarrollo de una enfermedad (ver *Capítulo 6*).

epigenéticos durante el desarrollo del animal del que fue tomado; para que funcione como el núcleo de un óvulo fecundado estos cambios deben ser reversibles. Se supone que esta reprogramación epigenética se lleva a cabo en el citoplasma del óvulo en el que el núcleo es trasplantado, por eso el reprogramado está incompleto y es imperfecto. Se han observado efectos similares pero a menor escala durante la reproducción asistida humana. Hay un aumento de riego del síndrome de Beckwith-Widemann en los nacidos por fertilización *in vitro*. El riesgo no es muy alto (1 de cada 5000), pero definitivamente mayor que el de los niños concebidos de manera natural. Se piensa que las circunstancias anormales de las concepciones FIV pueden interferir de algún modo con la programación epigenética, dando como resultado un incremento en el riesgo de enfermedad epigenética.

Algunas personas piensan que los cambios epigéneticos juegan un papel fundamental en la adaptación humana a un entorno cambiante. Una teoría controvertida (la "hipótesis Barker", ver Barker, 1995) mantiene que el equilibrio general del metabolismo de una persona (su tendencia a la obesidad, a la hipertensión, etc.) está en gran parte determinado por su estatus nutricional intrauterino y el de su vida neonatal temprana. Esta adaptación podría depender de mecanismos epigenéticos. El gen *IGF2* puede ser una pieza clave de este proceso, ya que tiene importantes papeles en la regulación del metabolismo y se sabe que está sujeto a efectos de *imprinting*.

Aún más polémico, un número de observaciones epidemiológicas apoyan la idea de los efectos *transgeneracionales* epigenéticos. Esta es un área difícil de estudiar porque las hipótesis analizadas son nuevas y no muy precisas, y los datos incluyen un gran número de variables. Esto incrementa considerablemente los problemas de interpretación. Los efectos transgeneracionales a lo largo de la línea femenina son difíciles de interpretar porque la transmisión de señales metabólicas a lo largo de la placenta puede ser una explicación. Para los efectos transmitidos a lo largo de la línea masculina, la transmisión epigenética parece el candidato más probable. Los efectos de la posible transmisión masculina transgeneracional incluyen:

- Estudios históricos del norte de Suecia que muestran una asociación entre la alimentación infantil dada por el padre y/o abuelos paternos y la longevidad del *probandus* o el riesgo mortalidad por diabetes/cardiovascular (Kaati *et al.*, 2002, Pembrey *et al.*, 2006).
- Un estudio contemporáneo en una cohorte del Reino Unido muestra una asociación entre la edad de inicio en el tabaco en la preadolescencia y el incremento del índice de masa corporal de sus futuros hijos a los 9 años (Pembrey *et al.*, 2006).
- Una población contemporánea de Taiwan que muestra una asociación entre mascar la semilla del betel y el inicio temprano del "síndrome metabólico" en su descendencia (Chen *et al.*, 2006). El "síndrome metabólico" incluye obesidad, resistencia a la insulina, presión arterial elevada y un aumento del riego de diabetes y enfermedad cardiovascular (ver *Sección 13.1*), por lo que hay un cierto solapamiento entre estas tres respuestas transgeneracionales.

Dado que es deseable estar adaptado a nuestro ambiente, uno tiene que preguntarse por qué los efectos epigenéticos transgeneracionales propuestos parece que

nos adaptan mejor al ambiente de nuestros abuelos que al propio. Se podría decir que los efectos transgeneracionales son solo una pequeña parte de la programación epigenética general, pero porque son antiintuitivos nos fuerzan a tomarnos las explicaciones epigenéticas seriamente.

7.5. Referencias

Barker DJP (1995) Fetal origins of coronary heart disease. *Br. Med. J.* 311: 171–174. For a hostile comment see Paneth N and Susser M (1995) Early origin of coronary heart disease (the 'Barker hypothesis') *Br. Med. J.* 310: 411–412. *Los textos completos están disponibles de manera gratuita en* http://bmj.bmjjournals.com.

Carrel L y Willard HF (2005) X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature,* 434: 400–404.

Chen TH-H, Chiu YH y Boucher BJ (2006) Transgenerational effects of betel-quid chewing on the development of the metabolic syndrome in the Keelung Community-based Integrated Screening Program. *Am. J. Clin. Nutr.* 83: 688–692.

Hendrich D y Bickmore W (2001) Human diseases with underlying defects in chromatin structure and modification. *Hum. Mol. Genet.* 10: 2233–2242.

Horsthemke B y Ludwig M (2005) Assisted reproduction: the epigenetic perspective. *Hum. Reprod. Update,* 11: 473–482

Jones PA y Baylin SB (2003) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Rev. Cancer,* 3: 415–428. *Este artículo es sobre el cáncer, pero los mecanismos que describe son generales.*

Kaati G, Bygren LO y Edvinsson S (2002) Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *Eur. J. Hum. Genet.* 10: 682–688.

Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G, *et al.* (2006) Sex-specific male-line transgenerational responses in humans. *Eur. J. Hum. Genet.* 14: 159–166.

Wilkins DF y Haig D (2003) What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. *Nat. Rev. Genet.* 4: 359–368.

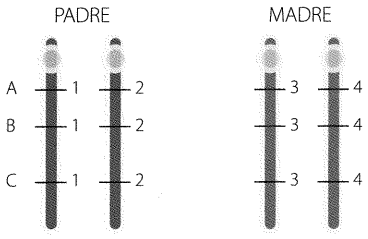
Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Doerfler W y Horsthemke B (1997) A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the *SNRPN* locus. *Eur. J. Hum. Genet.* 5: 94–98.

7.6. Ejercicios de autoevaluación

(1) Un gen en el cromosoma 6 tiene un *imprinting* de tal manera que solo se expresa cuando es heredado por vía paterna. La ausencia total de la expresión del gen causa una apariencia facial anormal. Dibuje el árbol genealógico esperado si una mutación de pérdida de función se segrega a lo largo de la familia.

(2) Repita el ejercicio 1 teniendo en cuenta que el *imprinting* es tal que el gen se expresa solo del cromosoma materno.

(3) En un análisis de inactivación del X, como el que se realizo a Pilar Portillo (Caso 16) y a sus hermanas, tras la digestión con *Hpa*II el producto es llevado a ebullición durante 10 min de tal forma que se eliminan todas las trazas de la enzima de restricción antes de que sean añadidos los reactivos de la PCR. ¿Por qué es esto necesario?



(4) El diagrama muestra de tres tipos de polimorfismos de ADN en el cromosoma 15 en los padres de un niño. El marcador A se encuentra dentro de la región crítica PWS/Angelman; los otros dos marcadores se encuentran distales a esta región. Escriba los posibles genotipos del niño si tiene:

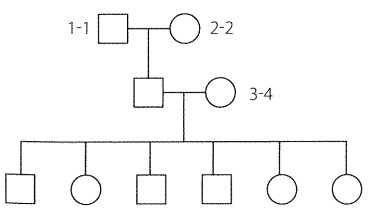
a) PWS debido a una deleción
b) Síndrome Angelman debido a una deleción
c) PWS debido a una disomía uniparental
d) Síndrome Angelman debido a una disomía uniparental
e) PWs debido a un error de imprinting
f) Síndrome Angelman debido a una mutación en el gen *UBE3A*

(5) Repita el ejercicio 4 teniendo en cuenta que durante la meiosis paterna hubo un entrecruzamiento entre las posiciones de los marcadores A y B, y en la meiosis materna entre los marcadores B y C (esto no es tan irreal, ya que normalmente hay al menos un entrecruzamiento en cada brazo de cada cromosoma durante la meiosis)

(6) Parte de una secuencia de ADN es:

```
          m              m      m m    m
5' CACTGCGGCAAACAAGCACGCCTGCGCGGCCGCAGAGGCAG 3'
```

Las citosinas indicadas están o todas metiladas, o todas sin metilar, dependiendo de su origen paterno. Se trata el ADN con bisulfito sódico y luego se utiliza un cebador de PCR para hacer la cadena complementaria. El cebador utilizado está a la derecha del diagrama. Diseñe un cebador de 10 nucleótidos para amplificar de manera específica las versiones metilada y no metilada de esta secuencia en conjunto con el cebador *downstrean*, y escriba la secuencia de esta parte del producto de PCR. (Los cebadores reales tendrían unos 20-40 nucleótidos; tienen que ser más largos que los de las PCRs convencionales porque puede ser imposible salvar algunos desemparejamientos dependiendo de que citosinas estén metiladas.)



(7) El árbol genealógico muestra los genotipos para un marcador de ADN polimórfico que está situado en la región pseudoautosómica Xp-Yp. Dibuje los posibles genotipos de todas las personas del árbol.

Biblioteca

Capítulo **8**

Efecto de los genes en el metabolismo, la respuesta a los medicamentos y el sistema inmunitario

Conceptos y habilidades que aprenderá en este capítulo

Después de estudiar este capítulo será capaz de:

- Describir los principios básicos de los errores innatos del metabolismo y poner ejemplos de enfermedades causadas por bloqueos metabólicos.
- Poner ejemplos de variaciones individuales en respuesta a medicamentos, explicando su importancia.
- Discutir críticamente las perspectivas de la medicina personalizada basada en el análisis genético.
- Describir la naturaleza y función del complejo mayor de histocompatibilidad y el papel de la compatibilidad del HLA en los trasplantes.
- Describir a grandes rasgos los mecanismos genéticos que sostienen nuestra capacidad de producir una respuesta inmune específica contra cualquier antígeno externo.

8.1. Historias clínicas

CASO 19 | Familia Stott | **199** | 210 | 376

- Segundo embarazo; la ecografía sugiere un varón.
- Bebé nacido con genitales ambiguos
- FISH para cromosomas
- ? Hiperplasia adrenal congénita

Sarah y Steven Stott ya tenían una hija y se pusieron muy contentos cuando la ecografía de su segundo embarazo parecía indicar que el bebé era un niño. Sin embargo, cuando el recién nacido fue examinado por la enfermera tras el nacimiento, esta se preocupó y avisó al pediatra. Le explicó a Sarah y Steven que el bebé tenía genitales ambiguos y podía ser un niño varón con una anomalía denominada hipospadias o una niña virilizada por un problema hormonal. Por otro lado, el bebé estaba bien, pero el pediatra solicitó análisis urgentes de sodio y potasio, y un estudio cromosómico. Utilizando estudios de FISH, el laboratorio de citogenética fue capaz de diagnosticar rápidamente que el bebé era cromosómicamente una niña y las pruebas bioquímicas eran normales. El pediatra pidió a su colega pediatra endocrinólogo que tomara parte en el caso y se tomaron muestras para analizar los niveles de 17-hidroxiprogesterona y testosterona. También se enviaron muestras al laboratorio de genética molecular para realizar las pruebas genéticas de la hiperplasia adrenal congénita. Cuando se obtuvieron los resultados se confirmó el diagnóstico. El bebé, que entonces



se llamó Susie, padecía el tipo menos grave en el que no se pierden las sales. Sus niveles de 17-hidroxi-progesterona y testosterona estaban aumentados, y se encontraron mutaciones en ambas copias de los genes *CYP21*. Se inició el tratamiento con hidrocortisona y la cirugía se planeó más tarde para ese año. Cuando Sarah y Steven miran atrás a la primera semana de vida de Susie, recuerdan lo difícil que fue para ellos, porque estaban muy preocupados por el bebé; no podían decirles a sus amigos y parientes si habían tenido un niño o una niña ni tampoco elegir un nombre para el bebé.

Figura 8.1 – Genitales ambiguos de un bebé femenino con la forma simple de virilización por hiperplasia adrenal congénita.

CASO 20 Familia Tierney **200** 213 310 376

- Jason, niño de 4 años
- Pálido con hematomas extensos y taquicardia
- ? Leucemia aguda linfoblástica

Jason es un niño de 4 años previamente sano que presenta una historia de dos semanas de hematomas extensos y dolor de espalda. Su madre lo llevó al médico de familia que observó que estaba pálido y tenía taquicardia (alta velocidad del pulso) sin fiebre aparente. Los análisis de sangre revelan baja cantidad de hemoglobina (anemia), un aumento en el recuento de células blancas (90 14 × 10^9/l, tasa normal 4–11 × 10^9/l) y bajo número de plaquetas. El análisis muestra una cifra elevada de linfocitos. Estos resultados plantean la posibilidad de un diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda infantil.

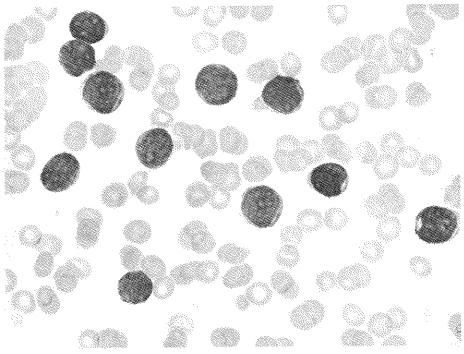


Figura 8.2 – Apariencia típica de la leucemia linfoblástica aguda. Pequeños blastos con cociente núcleo-citoplasma elevado, algunos con prominentes nucleolos. Foto cortesía del Dr. John Yin, Manchester Royal Infirmary.

8.2. Antecedentes

En este capítulo trataremos tres áreas de la genética, todas ellas concernientes a causas de diferencias genéticas entre las personas:

- Errores innatos del metabolismo.
- Variaciones comunes en la respuesta a fármacos **(farmacogenética).**

- Los sistemas que posibilitan el lanzamiento de la respuesta inmune contra cualquier antígeno externo, pero que también son los responsables del rechazo de los trasplantes (**inmunogenética**).

Esta y la *Sección 8.4* están divididas en tres partes que abarcan estas tres áreas.

Errores innatos del metabolismo

El concepto de errores innatos del metabolismo se desarrolló en los comienzos de la genética clínica (ver *Cuadro 8.1*). Si una ruta metabólica requiere la acción secuencial de varias enzimas, una mutación con pérdida de función en cualquiera de los genes que codifican para esa proteína dará lugar a un bloqueo metabólico (*Figura 8.3*). El substrato se acumula antes del bloqueo y se produce una pérdida del producto más abajo del bloqueo.

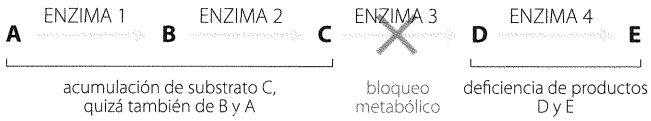


Figura 8.3 – Efectos de un bloqueo metabólico en una ruta simple.

- En una ruta biosintética el efecto más evidente es la probable ausencia del producto final. Por ejemplo, la tirosinasa es la enzima clave para la biosíntesis de melanina y la pérdida homocigota de la función de la tirosinasa produce albinismo (*Figura 8.4*).
- En una ruta de degradación, es frecuente la acumulación del substrato bloqueado que va a producir problemas. Las enfermedades de depósito lisosomales son un ejemplo típico. Los lisosomas son vesículas que contienen una colección de alrededor de 40 enzimas hidrolíticas diferentes, requeridas para degradar una amplia variedad de grandes moléculas. Los lisosomas importan material de alto peso molecular, pero solo pueden exportar los productos de bajo peso molecular correspondientes a las reacciones de degradación. Una deficiencia en alguna enzima lisosomal va a ser la causa de que material de alto peso molecular no degradado o parcialmente degradado se acumule en el interior del lisosoma. Esto puede llevar finalmente a la muerte de la célula. Los pacientes con enfermedades de depósito lisosomales son normales al nacer, pero ocurre un deterioro progresivo según se acumula el material sin degradar en los lisosomas. Por ejemplo, en las mucopolisacaridosis como el síndrome de Hunter (OMIM 309900) y el síndrome de Hurler (OMIM 607014), la pérdida de una u otra enzima requerida para la rotura de los glicosaminoglicanos (mucopolisacáridos) da lugar a la acumulación de material de alto peso molecular que no se puede degradar ni exportar. La *Figura 10.1* ilustra las consecuencias en una enfermedad de depósito lisosomal, la enfermedad de Tay-Sachs.
- La elevada concentración de substrato antes de un bloqueo en una ruta de degradación o de síntesis también puede dar lugar a la producción de metabolitos anormales. Por ejemplo, en la fenilcetonuria (ver familia

Vlasi, Caso 22 en el *Capítulo 11*) un bloqueo en la ruta catabólica de la fenilalanina lleva a una acumulación de fenilalanina en la sangre y en los tejidos (*Figura 8.4*). Esto deriva finalmente en la producción de fenilcetonas. Las porfirias (ver *Cuadro de enfermedad 8*) se producen por la acumulación de intermediarios patogénicos en una ruta de síntesis bloqueada.

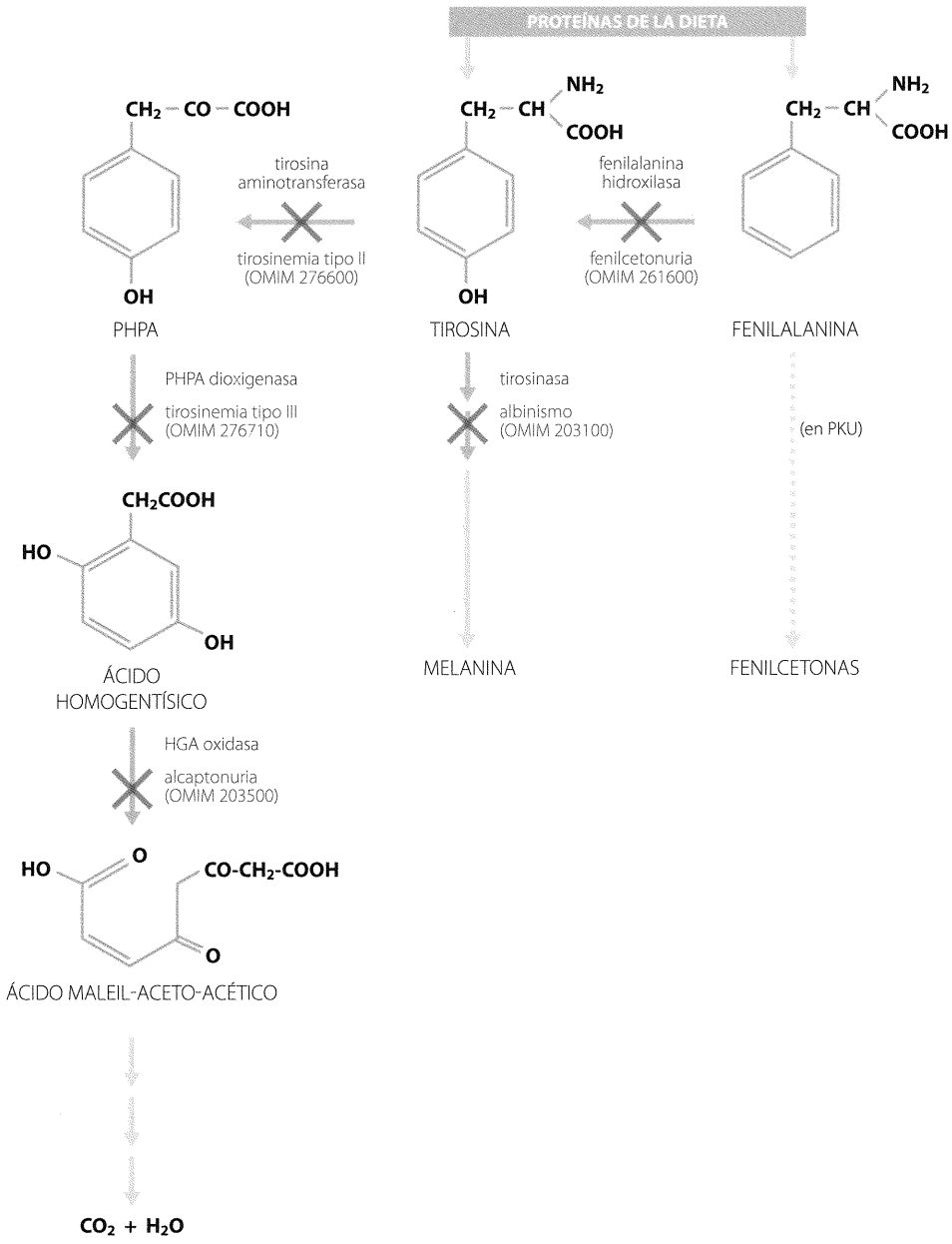


Figura 8.4 – Metabolismo de los aminoácidos fenilalanina y tirosina. Las consecuencias de un bloqueo metabólico pueden comprender ausencia del producto (albinismo), excreción del material inmediatamente encima del bloqueo (alcaptonuria) o excreción de metabolitos alternativos del substrato bloqueado (fenilcetonuria). PHPA = p-hidroxifenilalanina.

Cuadro 8.1

Algo de historia

El concepto de *errores congénitos del metabolismo* aparece muy pronto en genética humana: en 1902 Archibald Garrod publicó un artículo titulado "La incidencia de alcaptonuria: un estudio de individualidad química". La alcaptonuria (OMIM 203500, ver *Figura 8.4*) es una enfermedad recesiva poco frecuente en la que los individuos afectos pierden la homogentisato 1,2-dioxigenasa (también denominada oxidasa del ácido homogentísico) y, por tanto, excretan en su orina grandes cantidades de ácido homogentísico, un intermediario en el catabolismo de la fenilalanina y la tirosina. Este se oscurece en contacto con el aire, de aquí el nombre de la enfermedad. Garrod observó que los padres de los pacientes a menudo eran primos y que los hermanos/as en ocasiones estaban afectos. Especuló que la alcaptonuria podía ser una enfermedad mendeliana recesiva; una idea extraordinaria, dado que el trabajo de Mendel se había redescubierto solo dos años antes. En una serie de conferencias en 1908, Garrod acuñó el término "errores congénitos del metabolismo" y sugirió la cistinuria y la pentosuria como nuevos ejemplos.

Como Mendel, Garrod fue un adelantado a su tiempo. Los genetistas estaban más interesados en ese momento en comprender los mecanismos básicos de la herencia y los bioquímicos, en entender la química biológica básica. Los pacientes con enfermedades sumamente raras no eran los más adecuados a la investigación experimental. Unos 30 años después, Beadle y Tatum desarrollaron un sistema experimental adecuado, mutagénesis mediante rayos X y análisis bioquímicos del hongo *Neurospora crassa*. Su artículo de 1941 "Control genético de las reacciones bioquímicas en *Neurospora*" no contiene la frase "un gen-una enzima", pero dice:

> *Es posible, encontrando un número de mutantes incapaces de llevar a cabo un paso concreto en una síntesis dada, determinar si un único gen está relacionado con la regulación inmediata de una reacción química específica dada.*

En cinco años, Beadle había enunciado la hipótesis un gen-una enzima y la situó en el centro del conocimiento de la acción del gen. En ese momento no se conocía la estructura de las proteínas ni la de los genes. Un nuevo hito en el desarrollo fue la demostración de Ingram en 1956 de la diferencia entre la hemoglobina normal y la hemoglobina S. En los primeros años de los sesenta todos los conceptos básicos de la genética bioquímica sentaron sus bases.

La genética bioquímica se ha definido más por sus métodos y sus practicantes que por ninguna otra cosa. Durante el periodo 1960-1990, antes de que la PCR se convirtiera en una técnica de rutina, las posibilidades de análisis de la genética clínica mediante pruebas de ADN eran limitadas. Los bioquímicos, sin embargo, tenían un sofisticado conocimiento de las rutas metabólicas y la enzimología y lo aplicaban a cualquier enfermedad genética en la que estuviera indicado. Utilizaban herramientas especializadas, como la cromatografía de gas acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS), para identificar metabolitos anormales en sangre u orina. Llevaban a cabo programas de cribado a gran escala en recién nacidos, y estaban muy implicados en el trabajo con niños en los que se habían detectado errores congénitos. Esto les apartó ligeramente de la línea principal de la genética clínica. Actualmente, las dos tienen mucho que hacer juntas. Los bioquímicos no han abandonado su GC-MS y otras tecnologías especiales, pero el uso de métodos de ADN y de los conceptos procedentes de la bioquímica y la biología celular es universal.

La hiperplasia adrenal congénita (CAH), enfermedad que padece Susie Stott (Caso 19), ilustra una situación bastante compleja. La CAH es el resultado de un bloqueo metabólico que impide la producción de las hormonas glucocorticoides y mineralocorticoides. La *Figura 8.5* muestra la principal ruta sintética. Las enzimas implicadas son, en su mayor parte, miembros de la familia del citocromo P450 de enzimas oxidativas. Las enzimas P450 también están implicadas en el

metabolismo de muchos medicamentos. Algunas enzimas participan en múltiples reacciones, con varios substratos y catalizando más de una reacción. El resultado es más una red que una ruta lineal simple como la *Figura 8.3*.

La CAH puede ser el resultado de un fallo de alguna enzima de las cinco resaltadas en la figura, aunque el 95% de los casos son debidos a la deficiencia de 21-hidroxilasa. En las formas más graves (CAH con pérdida de sal) la pérdida de aldosterona causa episodios de amenaza de muerte debido a la pérdida de sal en los riñones. Susie es un ejemplo de la forma "simple virilizada" atenuada. La ausencia de hormonas glucocorticoides y mineralocorticoides produce un incremento en la secreción de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) a través de un bucle de retroalimentación, lo que da lugar a un incremento en la producción de andrógenos. Las mujeres se virilizan *in utero* en distinto grado debido al exceso de andrógenos. La anatomía interna es femenina normal, pero los genitales externos son ambiguos, requiriendo cirugía plástica tras el nacimiento. Una forma leve o atenuada de la CAH puede ser una causa de infertilidad en mujeres adultas. Las diferentes patologías se deben a distintas mutaciones en el gen de la 21-hidroxilasa, o diferente número de copias del gen (ver abajo).

Como se describe en el *Cuadro 8.2*, a menudo las mutaciones en el locus de la 21-hidroxilasa ocurren a través de la interacción con un pseudogen adyacente. Una consecuencia de ello es que las mutaciones que produce están limitadas a aquellas ya presentes en el pseudogen. Alrededor del 75% de todas las mutaciones pueden encontrarse comprobando algunas variantes específicas ya presentes en el pseudogen, sin tener que secuenciar los 10 exones del gen. Este es el procedimiento seguido en el caso de la familia Stott (Caso 19).

Farmacogenética

Es conocido desde hace años que muchos fármacos funcionan solo en una determinada proporción de las personas que los toman y pueden producir efectos no queridos o peligrosos en algunas personas (*Tabla 8.1*). La variación en la respuesta a fármacos es un problema clínico serio. Se estima que las reacciones adversas a los fármacos son responsables de alrededor de 100.000 muertes cada año en USA, mientras en UK uno de cada 15 ingresos en los hospitales son atribuidos a esta causa. Esta variación individual en la respuesta está en gran parte determinada genéticamente. Los factores genéticos afectan tanto a la farmacocinética (absorción, distribución, metabolismo y excreción del medicamento) como a la farmacodinámica (efecto actual del medicamento). En este momento existe un gran interés por utilizar análisis genéticos para determinar qué fármaco será mejor para un paciente. Muchos de los compuestos que están en las líneas de desarrollo de las compañías farmacéuticas serán probablemente ofrecidos en conjunción con un test genético. Un cínico podría argumentar que las compañías farmacéuticas no tienen interés en limitar el mercado de un medicamento, y en cambio sí tienen un arrollador interés en evitar las reacciones adversas graves. El coste total del desarrollo un nuevo fármaco y su introducción en el mercado puede ser superior a un billón de dólares y todo esto puede ser en vano si el fármaco tiene que ser retirado pronto tras el lanzamiento debido a los efectos adversos. De este modo las compañías farmacéuticas tienen un enorme interés

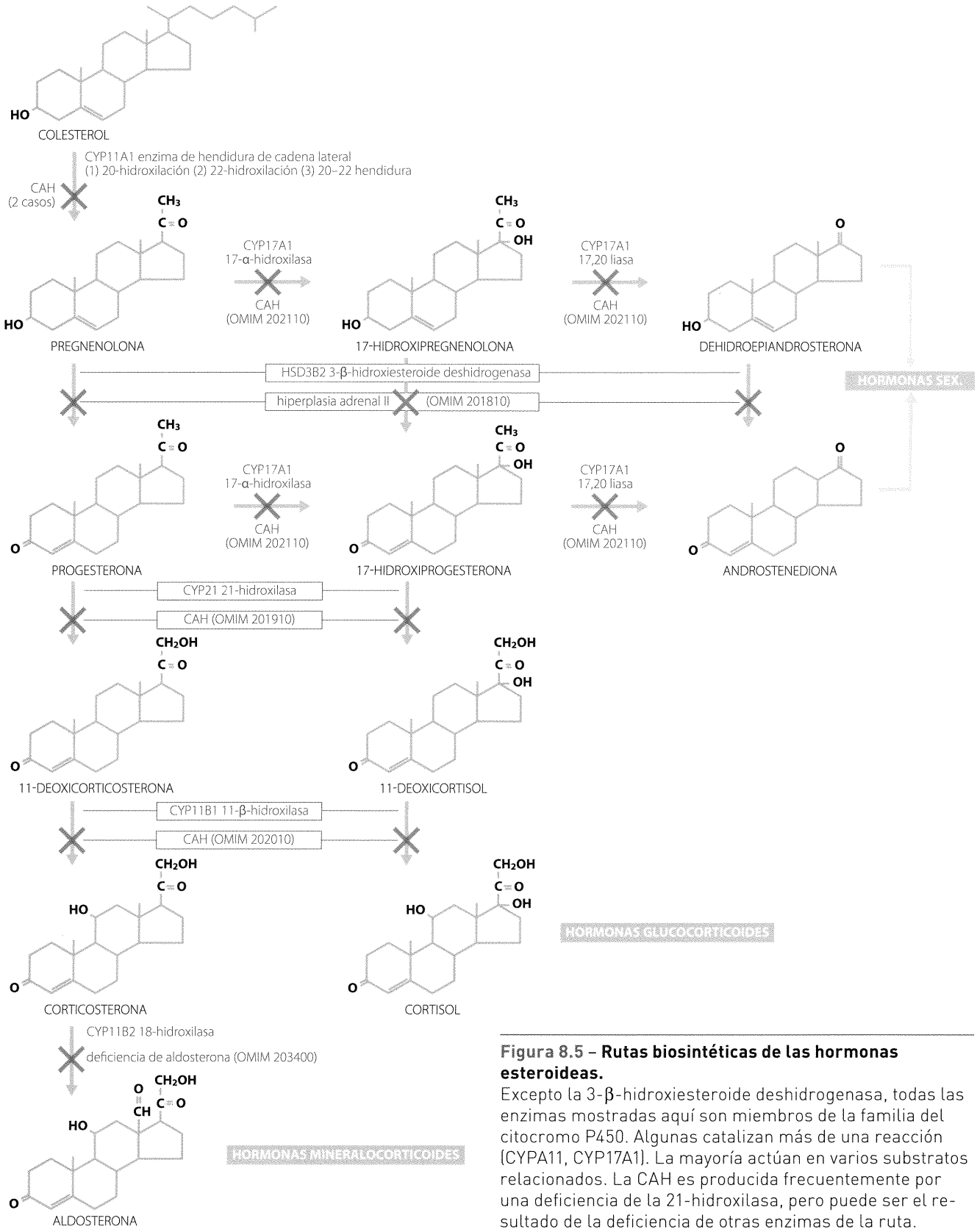


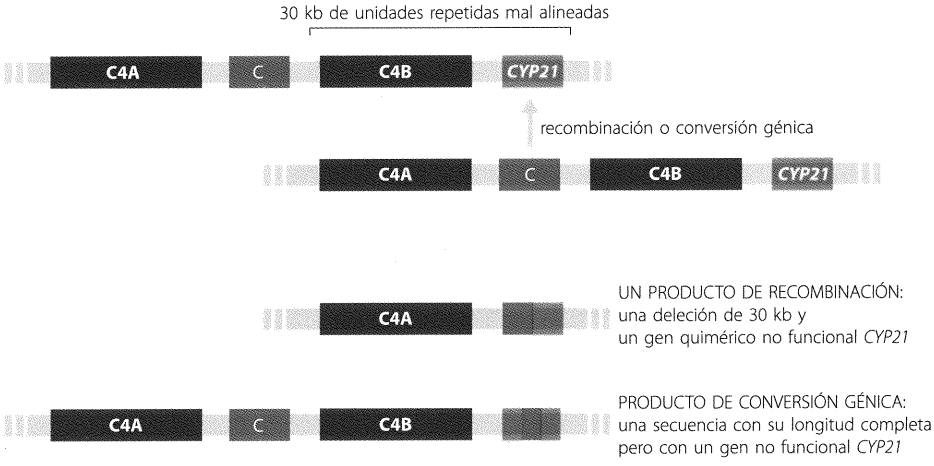
Figura 8.5 – Rutas biosintéticas de las hormonas esteroideas.
Excepto la 3-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, todas las enzimas mostradas aquí son miembros de la familia del citocromo P450. Algunas catalizan más de una reacción (CYPA11, CYP17A1). La mayoría actúan en varios substratos relacionados. La CAH es producida frecuentemente por una deficiencia de la 21-hidroxilasa, pero puede ser el resultado de la deficiencia de otras enzimas de la ruta.

Cuadro 8.2

Deleciones y conversiones génicas en la deficiencia de la 21-hidroxilasa

La investigación en la genética de la 21-hidroxilasa ha revelado un interesante mecanismo mutacional. El gen *CYP21* forma parte de una falsa secuencia duplicada en tándem dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en el cromosoma 6p21. Consideraremos las funciones principales del MHC posteriormente, cuando discutamos la inmunogenética. Hay una duplicación en tandem de 30 kb (ver la figura). Los genes *C4A* y *C4B* codifican para el factor de complemento 4, pero solo uno de los genes *CYP21* duplicados es funcional. *CYP21P* es un pseudogen inactivo. Comparado con su homólogo, ha adquirido varias mutaciones con pérdida de sentido tras *splicing* (corte y empalme), mutaciones *frameshift* y mutaciones sin sentido, alguna de ellas haría al gen no funcional. Como se mencionó en el *Capítulo 3*, las copias duplicadas de genes a menudo degeneran en pseudogenes porque no hay selección frente a las mutaciones al azar.

Las secuencias repetidas son puntos calientes para la duplicación y deleción a través de la recombinación entre repeticiones mal alineadas (*Cuadro de enfermedad 3*). El producto no funcional tiene una deleción de 30kb de una de las unidades C4-210H. Este mecanismo es el responsable del 20-25% de las mutaciones de la 21-hidroxilasa, y también de la existencia de un complejo rango de haplotipos en la población general, conteniendo una o tres copias de la repetición, con un número variable de genes funcionales y pseudogenes. En la mayor parte de los pacientes CAH, sin embargo, la estructura duplicada normal está todavía presente, pero el gen funcional ha adquirido mutaciones inactivantes idénticas a una o más de las que aparecen en el pseudogen. Análisis de variantes en las secuencias flanqueantes del gen muestran que no son recombinantes. Esta es la evidencia de **conversión génica,** un proceso por el cual una pequeña secuencia de ADN es reemplazada, por una copia de una secuencia con gran homología de la inmediata vecindad, pero sin recombinación. Los análisis de las mutaciones de la 21-hidroxilasa proporcionan la primera evidencia de que la conversión génica, un mecanismo conocido en hongos, también ocurre en mamíferos.



La mayoría de las mutaciones de la 21-hidroxilasa son el resultado de entrecruzamientos entre repeticiones mal alineadas de C4-210H. El 20-25% de los alelos mutantes tiene la deleción de 30 kb; el resto tiene la longitud total con parte de la secuencia funcional del gen reemplazada por la secuencia del pseudogen (ψ).

Aunque el resultado final es diferente, de hecho, la conversión génica es producto de un mecanismo de recombinación. Como se explicó en el *Capítulo 2*, la recombinación no implica dos cortes limpios hechos en los cromosomas implicados, sino más bien una pérdida de cadena del primer corte que invade a su homóloga. Los eventos siguientes pueden conducir

Cuadro 8.2 – Cont.

a la recombinación total o al reemplazo de un pequeño fragmento de la secuencia receptora invadida por la secuencia donante invasora. Las enzimas reparadoras de mal emparejamiento pueden entonces corregir cualquier mal emparejamiento en la secuencia receptora para emparejarla con la secuencia donante; además, el heterodúplex puede persistir hasta la siguiente ronda de replicación produciendo una célula hija con la secuencia duplicada completa del donante. La conversión génica es difícil de probar. Solo reemplaza a un pequeño fragmento de secuencia, alrededor de 100 pb. Si todos los productos de conversión pueden ser recuperados y caracterizados, como en algunos hongos, la naturaleza no recíproca del intercambio es evidente.

Tabla 8.1 – Ejemplos de medicamentos que producen graves efectos secundarios

Medicamento	Efecto
Azatioprina	Riesgo de muerte durante la supresión medular a dosis normales en personas con baja actividad de tiopurina metil transferasa
Fluorouracilo	Toxicidad fatal para el sistema nervioso con dosis estándar en personas con deficiencia de dihidropirimidina deshidrogenasa (1%)
Hidralacina	Riesgo de lupus eritematoso sistémico en acetiladores lentos
Isoniacida	Riesgo de polineuropatía en acetiladores lentos
Succinilcolina	Apnea prolongada en personas con deficiencia de pseudocolinesterasa
Warfarina	Sangrado excesivo en personas con baja actividad de *CYP2C9* o *VKORC1*

en comprender las bases de las reacciones adversas, para modificar la dosificación o las directrices de prescripción para minimizar el riesgo.

La mayoría de las diferencias individuales en la respuesta son debidas a grandes variaciones individuales en la velocidad del metabolismo de los fármacos.

Una proporción sustancial de todos los fármacos prescritos (quizás el 25-30%) comienza su eliminación con una oxidación enzimática catalizada por una de las tres enzimas, CYP2C9, CYP2C19 Y CYP2D6. Son miembros de la gran familia de enzimas de P450, que participan en la biosíntesis de esteroides. Los polimorfismos comunes afectan la actividad de cada una de estas enzimas. Las personas se clasifican como metabolizadores lentos, intermedios, importantes y ultrarrápidos (*Figura 8.6*). El efecto clínico de una dosis concreta de un medicamento es mayor en un metabolizador lento y mucho menor en un metabolizador ultrarrápido. Si se utiliza una dosis estándar, los metabolizadores ultrarrápidos no obtendrán beneficios del fármaco, mientras que los lentos pueden sufrir sobredosis.

Algunos medicamentos requieren la acción de P450 para producir su forma activa. La codeína se transforma, mediante CYP2D6, en su forma activa, la mor-

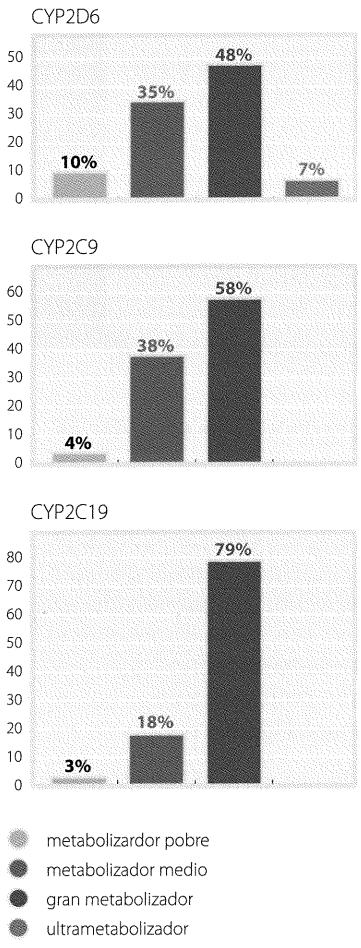


Figura 8.6 – Los polimorfismos en los genes *CYP2D6*, *CYP2C9* y *CYP2C19* producen variaciones comunes en la actividad enzimática. La variación está presente en todas las poblaciones, pero con diferentes frecuencias; estas gráficas pertenecen a personas de raza blanca del norte de Europa y han sido realizadas con los datos de Service (2005).

fina. Los metabolizadores lentos obtienen alivio con dosis estándar de codeína, mientras que los ultrarrápidos tienen un riesgo aumentado de efectos adversos como son los problemas respiratorios y la sedación.

Muchos otros sistemas enzimáticos están implicados en las variaciones farmacocinéticas. Un ejemplo es el riesgo de apnea prologada como un efecto adverso del relajante muscular quirúrgico suxametonio. Esto ocurre en pacientes homocigotos para la forma variante de la butirilcolinesterasa (gen *CHE1*, OMIM 177400). Otros fármacos son metabolizados vía acetilación, y las personas pueden dividirse en acetiladores rápidos o lentos la actividad de la N-acetiltransferasa.

El caso de la familia Tierney (Caso 20) concierne a una variante de la tiopurina metil transferasa (TPMT). Esta enzima cataliza el primer paso en la interrupción de los fármacos inmunosupresores azatioprina y mercaptopurina. Son utilizadas en trasplantes, para tratar la enfermedad inflamatoria abdominal y la artritis inflamatoria, y para la leucemia linfocítica aguda. En 1980, se describen los primeros casos de deficiencia de TPMT en células rojas sanguíneas, y los estudios establecen que la actividad reducida de TPMT en las células rojas sanguíneas se asocia a efectos adversos de tiopurinas, incluyendo azatioprina y 6-mercaptopurina. Alrededor del 10% de la población del Reino Unido es heterocigota para un alelo de baja actividad, y un 0,3% es homocigota. Estas personas son mucho más sensibles a los efectos de estos medicamentos. En los homocigotos de baja actividad, dosis normales pueden causar toxicidad en la médula ósea y colapso del sistema hematopoyético. El estado de TPMT puede ser analizado midiendo la actividad de la enzima o análisis del ADN del gen.

Los análisis de TPMT no predicen todos los casos de neutropenia u otros efectos secundarios asociados a la utilización de estos fármacos. Pero en 2004 la FDA en Estados Unidos indicó que la 6-mercaptopurina debe incluir una etiqueta de información especificando la disponibilidad de los tests genéticos y fenotípicos para determinar el estado de TPMT. Actualmente se está llevando a cabo un ensayo controlado randomizado en el Reino Unido para determinar la utilidad clínica y el coste de la utilización de las pruebas TPMT como rutina previa al tratamiento con tiopurinas. Ver McLeod y Siva (2002) para más información.

Para más información spbre los efectos genéticos en la acción de los medicamentos, lea los artículos de Evans y McLeod (2003) y Weinshilboum (2003).

Inmunogenética

La inmunogenética implica dos aspectos principales:

- Entender cómo podemos producir un número infinito de anticuerpos específicos diferentes, en clara oposición a la hipótesis un gen–un polipetido.
- Entender cómo podemos distinguir lo propio de lo ajeno, y montar una respuesta inmune contra cualquier célula extraña o antígeno.

Aquí ponemos de manifiesto la genética detrás del reconocimiento del problema; los mecanismos para generar la diversidad de anticuerpos están descritos en la *Sección 8.4*. La inmunogenética es una materia muy amplia y el tratarla aquí es meramente introductorio. Cualquier libro de texto reciente de inmunología pro-

fundizará mucho más en este área fascinante de la genética. En el *Capítulo 5* de *Inmunobiology* de Janeway *et al.* (2001) puede encontrar una buena fuente.

Como es sabido, los órganos trasplantados se rechazan a no ser que sean compatibles. Esto resulta ser un problema para Pablo Portillo (Caso 16) que necesita un trasplante de médula (ver *Sección 8.3*). Los determinantes principales del rechazo son los antígenos codificados por los genes del MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) localizados en el cromosoma 6p21.3. Los trasplantes totalmente compatibles en MHC normalmente no son rechazados. Por desgracia, la compatibilidad total del MHC rara vez se alcanza, excepto en gemelos idénticos, ya que el MHC es la región más polimórfica y variable del genoma humano.

Los genes están fuertemente empaquetados en el MHC; el "MHC clásico" contiene alrededor de 200 genes en una región de 4.1 Mb, aunque la mitad de ellos son pseudogenes que no se expresan. De forma poco común, algunos genes están relacionados funcionalmente. En los organismos superiores los genes relacionados así suelen estar dispersos, aparentemente al azar, en el genoma, excepto algunos *cluster* duplicados recientemente o divergentes. En el MHC, sin embargo, la mayoría de los genes participan en el proceso inmune, aunque hay excepciones, como el gen de la 21-hidroxilasa, ya mencionado. Dentro del MHC, las claves determinantes en el reconocimiento de lo propio y lo ajeno son moléculas de superficie de las células codificadas por una serie de genes estructuralmente relacionados, los genes Antígeno Humanos Leucocitarios (HLA).

Los genes HLA se dividen en Clase I y Clase II.

- Las moléculas de la Clase I están presentes en la superficie de la mayoría de las células nucleadas. Están formadas por una cadena pesada, codificada por un gen HLA, y una cadena ligera constante, la β2-microglobulina, codificada en el cromosoma 15. Existen 26 genes de la Clase I en el MHC, pero solo nueve son funcionales. Las moléculas HLA-A y HLA-B son los antígenos más importantes de Clase I para la compatibilidad de tejidos. Ambos loci son altamente polimórficos: con 511 alelos registrados, el locus HLA-B es el más polimórfico del genoma humano.
- Los antígenos de Clase II se encuentran principalmente en linfocitos B y macrófagos. Están compuestos de cadenas alfa y beta, ambas codificadas dentro del MHC. De los 24 loci de Clase II, 15 son funcionales. Las moléculas principales de la Clase II son DR, DP y DQ, y de nuevo son altamente polimórficas (en 2001 un comité de la OMS listó 323 alelos de DRβ).

Hay una selección a favor de esta extensa variabilidad. Los alelos suelen diferir en bloqueos sustanciales de residuos de aminoácidos, sugiriendo que la recombinación y la conversión génica son vitales en la generación de diversidad.

Las moléculas HLA presentan péptidos derivados de proteínas externas de los linfocitos T. Las moléculas de Clase I presentan antígenos endógenos a células T $CD8^+$, mientras que las de Clase II presentan antígenos exógenos a células T $CD4^+$. Las células T inician una respuesta inmune frente, aquellos péptidos que no reconocen como propios presentados por moléculas HLA propias, o células que llevan moléculas HLA que no son propias. Las células T que responden a los péptidos propios presentados por moléculas HLA propias son eliminadas durante el desarrollo temprano ("eliminación clonal"). La respuesta de las células portado-

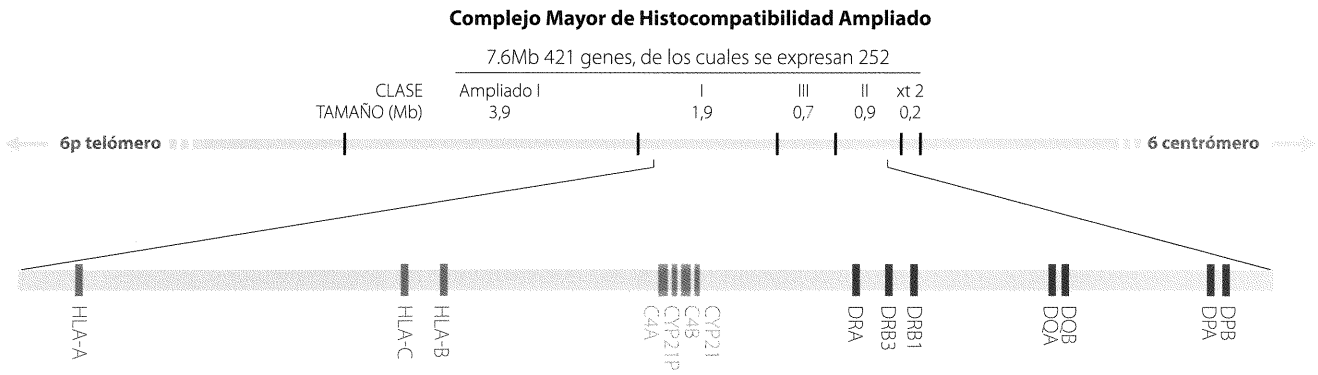


Figura 8.7 – El locus humano de MHC en 6p21.3 está dividido en regiones Clase I, II y III, con ampliaciones hacia cualquiera de los dos extremos.
La figura muestra los genes más importantes para la compatibilidad de tejidos, junto con el "cluster" C4/21-hidroxilasa. Datos procedentes de Horton *et al.* (2004).

ras de moléculas ajenas (no propias) es la causa de los rechazos en los trasplantes. Idealmente un donante de trasplante y el receptor deberían ser compatibles para ambos alelos de los loci HLA-A, -B y -DR (seis coincidencias). Con los tratamientos inmunosupresores modernos, el trasplante mediante compatibilidades a menudo se realiza con éxito, pero la inmunosupresión acarrea problemas en sí misma.

8.3 Estudio de pacientes

CASO 19 | Familia Stott | 199 | **210** | 376

- Segundo embarazo; la ecografía sugiere un varón
- Bebé nacido con genitales ambiguos
- FISH para cromosomas
- ? Hiperplasia adrenal congénita
- PCR para buscar mutaciones

La homología del 98% en la secuencia entre el pseudogen *CYP21P* y el gen activo, y el variable número de copias de cada gen, hacen que la investigación molecular de CAH sea un desafío. Las grandes deleciones solo pueden ser determinadas mediante técnicas de *Southern blot*, comparando las posiciones e intensidades de las bandas de hibridación de cada progenitor y del hijo afecto. Las mutaciones debidas a conversión génica pueden ser identificadas mediante una batería de análisis de PCR. El protocolo utilizado analiza seis puntos específicos de mutación, para una deleción de 8 pb en el exón 3, y para genes quiméricos comprendiendo las secuencias 5' del pseudogen y 3' del gen funcional. Estos comprenden el 70% de todas las mutaciones. De nuevo, definir las mutaciones implica comparar los resultados del niño con los de ambos padres a través de una serie de análisis de PCR. Los análisis dependen del hecho de que el cebador de PCR solo trabaja si el nucleótido terminal 3' está correctamente apareado con la secuencia molde (ver *Figura 5.5*).

Se utiliza un protocolo de PCR en dos pasos. El gen funcional (*CYP21*) y el pseudogen (*CYP21P*) se diferencian en numerosos puntos de mutación; esto puede ser explotado para diseñar cebadores de PCR gen-específicos. Así, el primer paso de la PCR es realizar un diseño para amplificar el gen funcional nada más. El producto de esta reacción (si hay alguno) no se analiza, pero se utiliza como material inicial para la segunda reacción de PCR, que usa cebadores alelo específicos para detectar cada punto de mutación individual. En este segundo paso, se desarrollan dos reacciones de PCR alternativas, una con los cebadores espe-

cíficos de la secuencia mutante y la otra con los correspondientes a la secuencia normal. La ausencia de algún producto en ambas reacciones de PCR implicaría que no existía material inicial. Esto quería decir que la primera reacción de PCR no dio lugar a ningún producto, lo que solo podría significar que únicamente la secuencia de *CYP21P* estaba presente en la muestra original. Es crucial incluir cebadores de PCR para una secuencia control en cada reacción, para confirmar que la ausencia de producto es específica y no es debida a un fallo de la reacción de PCR. La Tabla 8.2 muestra los resultados.

Tabla 8.2 – Resultados del análisis mutacional de la 21-hidroxilasa de Susie Stott

1ª ronda de PCR de amplificación específica	2ª ronda de PCR para comprobar	Resultado en el niño
(1) Exones 1–3 de *CYP21* solo	Mutación 89C>T Mutación 655A/C/G	Normal (C) Normal
(2) Exones 3–10 de *CYP21* solo	Mutación 999T>A Mutación 1683G>T Mutación 1994C>T Mutación 2108C>T	Solo mutante (A) Normal (G) Normal (C) Normal (C)
(3) Exones 3–6 cualquiera *CYP21* o 5'-*CYP21P*–3'-*CYP21* gen quimérico	Deleción 8 pb	Heterocigoto
(4) Exones 3–6 de *CYP21* solo	Deleción 8 pb	Normal

Los resultados del análisis específico de mutación utilizando los productos de las dos primeras reacciones primarias de PCR son compatibles con varias posibilidades:

- Homocigosidad para la mutación 999T>A.
- Heterocigosidad compuesta, un alelo de *CYP21* ha adquirido la mutación simple 999T>A, el otro es un gen quimérico que no se amplificaría en la PCR primaria.
- Heterocigosidad compuesta, un alelo de *CYP21* ha adquirido la mutación simple 999T>A, el otro tiene una gran deleción (se ha visto en alrededor del 25% de los casos).

La tercera reacción muestra la presencia de la deleción de 8 pb característica del pseudogen. Ahora, las posibilidades son:

- Heterocigosidad compuesta para la mutación 999T>A y deleción de 8 pb, ambas introducidas en el gen *CYP21* mediante conversión génica.
- Heterocigosidad compuesta, un alelo de *CYP21* ha adquirido la mutación simple 999T>A, el otro es un gen quimérico que porta la deleción de 8 pb, y probablemente otros cambios pseudogen-específicos.
- La presencia de ambas mutaciones en el mismo cromosoma, conteniendo más de un gen *CYP21* mutado (duplicaciones del gen *CYP21*, duplicaciones génicas de *CYP21P* y deleciones del gen *CYP21P* son comunes y no patogénicas en la población general); el otro cromosoma no contiene gen *CYP21*.

La cuarta reacción de PCR muestra que la deleción de 8 pb debe estar en el gen quimérico. Los resultados se muestran en el carril 1 de cada gel en la *Figura 8.8*. Es necesario comprobar si ambos cambios detectados podrían estar en el mismo cromosoma. Esto se realiza analizando a los padres con las mismas reacciones primarias de PCR y las PCR secundarias a mutación específica (Tabla 8.3).

Se ha visto que las dos mutaciones provienen una de cada progenitor, lo que confirma que estén en dos copias diferentes del cromosoma 6 de la niña. Los

Tabla 8.3 – Resultados del análisis mutacional de la 21-hidroxilasa en los padres

1ª ronda de PCR de amplificación específica	2ª ronda de PCR para comprobar	Resultado en el padre	Resultado en la madre
(1) Exones 1–3 de *CYP21* solo	Mutación 89C>T	Normal	Normal
(2) Exones 3–10 de *CYP21* solo	Mutación 999T>A	Normal	Heterocigoto
(3) Exones 3–6 cualquiera *CYP21* o 5'-*CYP21P*–3'-*CYP21* gen quimérico	Deleción 8 pb	Heterocigoto	Normal
(4) Exones 3–6 de *CYP21* solo	Deleción 8 pb	Normal	Normal

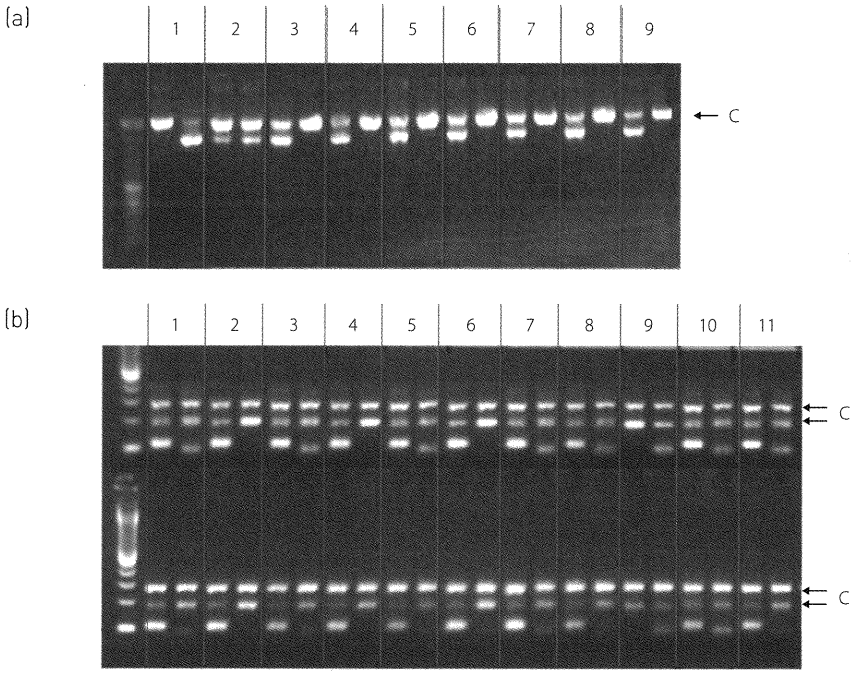


Figura 8.8 – Identificación del genotipo 21-hidroxilasa. (a) Análisis de la mutación 999T>A (análisis 2 en *Tabla 8.2*) por amplificación alélica específica de los alelos T (carril izquierdo) o A (carril derecho). Las muestras 1, 2 y 3 son A/A, A/T y T/T. (b) Análisis de la deleción de 8 pb en el gen *CYP21* o en el gen quimérico. El carril izquierdo de cada par amplifica solo el alelo no delecionado, el carril derecho amplifica solo el alelo delecionado (el cual corre un poco más deprisa porque es más pequeño). Para cada muestra la parte de arriba del gel amplifica la secuencia de *CYP21* o del gen quimérico (test 3 en *Tabla 8.2*) y la parte más baja del gen amplifica para *CYP21* (test 4 en *Tabla 8.2*). Todas las bandas marcadas con una C corresponden a los controles de PCR. Fotos cortesía del Dr. Simon Tobi, del St. Mary's Hospital, Manchester.

resultados del padre confirman que tiene un gen quimérico que incluye la deleción de 8 pb y también el gen *CYP21* normal.

El resultado total es que ahora conocemos que Susie es un heterocigoto compuesto para dos cambios de pérdida de función. Uno es una conversión génica que introduce un cambio T>A en el nucleótido 999 del pseudogen, dando lugar a una sustitución en el aminoácido I172V. Este alelo mutante conserva un nivel residual muy bajo de actividad de la 21-hidroxilasa. El otro es el resultado de una recombinación no emparejada que va a dar lugar a un gen quimérico completamente no funcional, la parte 5' del mismo (al menos por arriba del exón 3) deriva del pseudogen, mientras que la parte 3' (al menos desde el exón 6) proviene del gen *CYP21*. Probablemente Susie tiene suficiente actividad residual de la 21-hidroxilasa como para escapar del fenotipo severo de pérdida de sales, pero no el suficiente para evitar la virilización *in utero*.

CASO 20 — Familia Tierney | 200 | **213** | 310 | 376

- Jason, niño de 4 años
- Pálido con hematomas extensos y taquicardia
- ? Leucemia aguda linfoblástica
- Análisis de médula ósea y comprobación del diagnóstico
- Análisis enzimático de TPMT previo al tratamiento con 6-mercaptopurina

Los recuentos sanguíneos de Jason suscitan la posibilidad de un diagnóstico de leucemia aguda linfoblástica infantil (LAL). El diagnóstico de LAL lo confirma el pediatra del hospital local que realiza un análisis de médula ósea, en el que aparecen gran número de blastos (linfocitos inmaduros, ver *Figura 8.2*). Jason ingresa en el hospital y es tratado con quimioterapia de inducción, incluyendo prednisolona, vincristina, daunomicina y L-asparraginasa. Responde bien al tratamiento y avanza a un tratamiento de consolidación con metotrexato. Entonces comienza el tratamiento de mantenimiento con 6-mercaptopurina y metotrexato, el cual está planeado que continúe durante 3 años.

Previo al tratamiento con 6-mercaptopurina, se le tomó una muestra de sangre para realizar un análisis enzimático de TPMT. Este fármaco causa graves efectos adversos en las personas con baja actividad de TPMT. Tres variantes alélicas explican el 80-95% de los casos de actividad baja o intermedia (*Tabla 8.4* y *Figura 8.9*).

Tabla 8.4 – Alelos comunes de baja actividad de la tiopurina S-metiltransferasa

Alelo	Frecuencia en caucasianos
*TPMT**2	0,5%
*TPMT**3A	5%
*TPMT**3C	0,5%

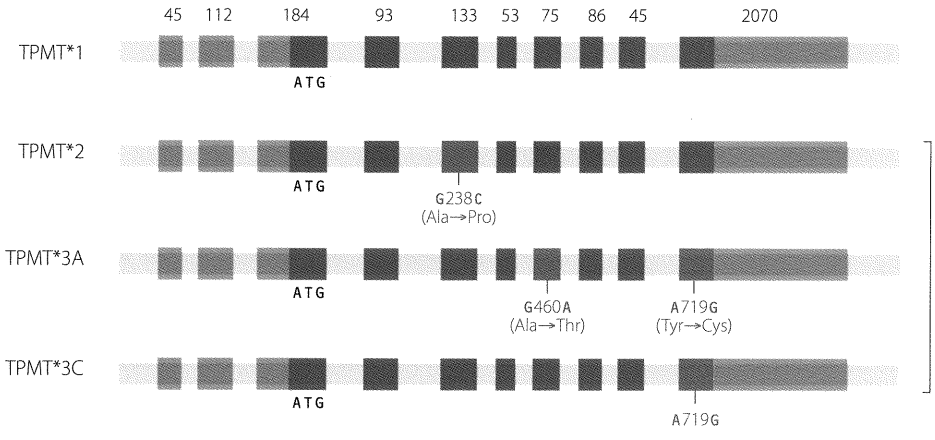


Figura 8.9 – Secuencia de alelos normales y de baja actividad de la tiopurina S-metiltransferasa.
Observa que la secuencia *TPMT**3A incluye dos cambios sin sentido.

El análisis de TPMT de Jason mostró un nivel normal de actividad enzimática. Sin embargo, tras comenzar el tratamiento Jason sufrió una sepsis neutropénica grave, una infección asociada a un bajísimo recuento de neutrófilos. Le dieron antibióticos vía intravenosa y un tratamiento de soporte y se recuperó bien. Los médicos observaron que antes de hacerle el análisis de TPMT había recibido una transfusión de sangre para corregir su anemia. Como el análisis de TPMT se realiza en células rojas sanguíneas, pudo dar lugar a una medida incorrecta del estado de TPMT. Entonces se envió una muestra de sangre para genotipar TPMT. Esta reveló que Jason era homocigoto para el alelo TPMT*3A, lo que predecía la ausencia de actividad de TPMT. Se le recomendó el mantenimiento del tratamiento con dosis reducidas de 6-mercaptopurina.

CASO 16 | Familia Portillo | 173 | 183 | **214** | 376

- Pablo, niño enfermizo
- Historia familiar de síntomas similares
- Los análisis sanguíneos sugieren inmunodeficiencia combinada grave ligada al X
- Comprobar que el trasplante de médula ósea es apropiado

En el capítulo anterior vimos el árbol genealógico de esta familia (*Figura 7.10*). Pablo fue diagnosticado de SCIDX1. El trasplante de médula es el tratamiento de elección para las inmunodeficiencias graves como la que Pablo padece. A primera vista un paciente inmunodeficiente puede parecer un receptor ideal para el trasplante. Pablo pierde todas las funciones de sus células T y entonces no puede rechazar el injerto. Sin embargo, el problema con los trasplantes de médula es la enfermedad injerto contra huésped (GvH). Si el injerto de médula ósea reconstituye el sistema inmune con éxito, reconocerá el tejido del huésped como extraño e iniciará una respuesta inmune que puede ser fatal. Una buena compatibilidad reduce el riesgo de que esto suceda. Pablo y otros miembros de su familia fueron tipados para HLA-A, -B y -DR con los resultados que muestra la *Figura 8.10.*

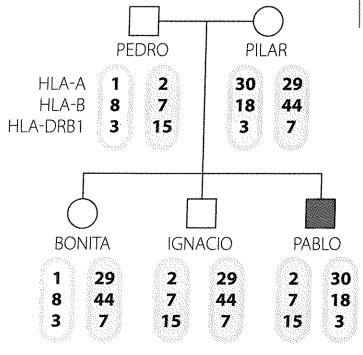


Figura 8.10 – Resultado del tipaje de HLA en la familia Portillo.
Como los loci HLA-A, -B y -DR están íntimamente ligados en el cromosoma 6, se heredan normalmente como un bloque (haplotipo).

Los hermanos tienen una posibilidad de cada cuatro de compartir ambos haplotipos del MHC. Por desgracia, ninguno de los hermanos de Pablo, Ignacio o Bonita, resultaron ser totalmente compatibles. Sus padres, por supuesto, cada uno compartía un haplotipo con él. Se buscó en los bancos de médula ósea para trasplante, esperando encontrar un donante no relacionado compatible, pero no se encontró. La *Tabla 8.5* muestra la frecuencia de cada uno de los alelos en españoles de la región de Murcia y del conjunto de los haplotipos de los que los miembros de la familia Portillo son portadores. Aunque estos se encuentran entre los haplotipos más comunes en esa población, la probabilidad al azar de que uno de los miembros de esta población tenga los mismos haplotipos que Pablo es de 1 por cada 1500.

El tiempo pasa y por fin se decide utilizar la médula de su madre, Pilar, para el trasplante. Se utiliza una nueva técnica para minimizar la enfermedad injerto contra huésped. El problema lo causan las células T de la médula del donante. En 1980 se desarrollaron técnicas para depleccionar las células T de la médula. Esto, en principio, hace posible restaurar la función inmune mediante trasplante de médula en pacientes con alguna forma de SCID. Algunas células T están presentes inevitablemente, así que es preferible que el trasplante sea lo más compatible posible, pero las no coincidencias no son el problema principal. El método se consiguió realizar recientemente en su centro regional de trasplantes, y así se tomó médula ósea de Pilar, se depleccionaron las células T y se infundió en Pablo. Sin embargo,

Tabla 8.5 – Frecuencias alélicas de la familia Portillo y haplotipos en la población española

Locus	Alelo	Frecuencia
HLA-A	1	0.095
	2	0.230
	29	0.083
	30	0.107
HLA-B	7	0.056
	8	0.052
	18	0.071
	44	0.179
HLA-DRB1	3	0.123
	7	0.179
	15	0.052

Haplotipo	Frecuencia observada	Frecuencia calculada
A1-B8-DR3	0.023	0.00011
A2-B7-DR15	0.019	0.00067
A29-B44-DR7	0.051	0.00266
A30-B18-DR3	0.035	0.00093

Observa que los genes HLA tienen tendencia a aparecer en combinaciones particulares. La frecuencia observada de cada haplotipo es más grande que el producto de las frecuencias alélicas individuales (mostrado en la columna de frecuencia calculada). Éste es un ejemplo de desequilibrio de ligamiento. Ver *Capítulo 13* para ampliar. Datos recogidos de www.allelefrequencies.net; observa que la nomenclatura ha sido simplificada.

los resultados fueron decepcionantes. El niño únicamente adquirió bajos niveles funcionales de células T. Evidentemente la médula había injertado pobremente. A pesar de recibir una reinfusión del trasplante, de nuevo de su madre, sucumbió a una infección por citomegalovirus y murió a la edad de 14 años. La experiencia sugiere que la tasa de éxito es mucho más baja en trasplantes llevados a cabo después de los 3,5 meses de edad. Buckley (2004) escribió una revisión completa y aconsejable de leer sobre el trasplante de médula ósea en SCID.

Pablo murió en 1989. En ese momento el gen causante de la enfermedad de la familia no había sido identificado. Las opciones para sus padres, si querían tener más hijos y deseaban someterse a diagnóstico prenatal, eran limitadas. Podrían optar por comprobar el sexo del feto y no llevar a término ningún embarazo en el que el sexo del feto fuera masculino. Haciendo esto, en la mitad de los casos los fetos no estarían afectos, lo que no era aceptable para Pilar y Pedro. Los genetistas podrían utilizar marcadores genéticos para tratar de identificar si el feto masculino había heredado el cromosoma X normal o el patológico de Pilar, como se describe en el *Capítulo 9*. Una muestra de ADN de Pablo se almacenó para ayudar en este supuesto, o para realizar un análisis de la mutación una vez que el gen fuera identificado. El problema era que el mapeo genético de X-SCID en ese momento no proporcionaba una localización clara. Probablemente el gen anormal se localizara en la zona proximal del brazo largo, en Xq12-q13, pero

existían algunas dudas sobre si era cierto en todos los casos. Así existía un riesgo de utilizar un marcador genético inapropiado, dando lugar a un falso negativo. Pedro y Pilar estaban poco dispuestos a asumir ese riesgo y como ya tenían dos niños sanos decidieron no tener más hijos; Pedro se hizo la vasectomía.

En 1993 se identificó el gen defectuoso de la X-SCID como *IL2RG*. Codifica para la subunidad gamma que forma parte de los receptores de diferentes citoquinas (interleuquinas 2, 4, 7, 9 y 15). La pérdida de señalización mediante citoquinas previene el desarrollo de células T y NK; las células B están presentes, pero no producen anticuerpos. El gen es bastante pequeño, está formado por ocho exones que cubren 4,2 kb en la localización Xq13. Se han descrito gran variedad de mutaciones de pérdida de función en hombres afectos.

La muestra de ADN de Pablo Portillo se recuperó (estaba congelada) y se analizó. Se encontró una sustitución C>T en el exón 7 que convertía el codón CGA que da lugar a arginina 293 en TGA que codifica para un codón stop o de parada (*Figura 8.11*). Observe que esta mutación ocurre en una secuencia CpG y el resultado es similar a la demetilación de una 5-metilcitosina. Se ha descrito varias veces en casos no relacionados, confirmando que esta secuencia particular CpG es un punto caliente mutacional. Antes, las hermanas de Pilar, Francisca y Elena, fueron analizadas para ver si eran portadoras, para comprobar que no se había producido una inactivación al azar del cromosoma X (*Capítulo 7*). Ahora se ha vuelto a contactar con ellas para ofrecerles el análisis definitivo de la mutación. Ambas han aceptado. Amplificando mediante PCR y secuenciando el exón 7 del gen se ha confirmado el patrón de inactivación del X, mostrando que Elena es portadora pero Francisca, no. Queda pendiente contactar con las hijas de Pilar y Elena cuando tengan alrededor de 16 años y puedan ser informadas y tomar una decisión sobre la realización del análisis de portadores.



Figura 8.11 – Mutación en el gen *IL2RG* que produce X-SCID en Pablo Portillo.
X en la secuencia mutante se traduce en un codón de parada.

Años más tarde otro bebé afecto nació en una rama diferente de la familia, y en ese momento había más posibilidades de tratamiento. Ver *Capítulo 14*.

8.4. Resumen y ampliación

Errores innatos del metabolismo

¿Un gen, muchas enzimas?

La hipótesis un gen-una enzima aunque no es cierta en todas las circunstancias, es la idea esencial en la genética bioquímica. ¿Cómo podemos explicar las enfermedades en las cuales un único defecto en un gen da lugar a múltiples enzimas defectuosas? Dos ejemplos ilustran cómo defectos en modificaciones postraduccionales pueden causar la pérdida de actividad de múltiples enzimas:

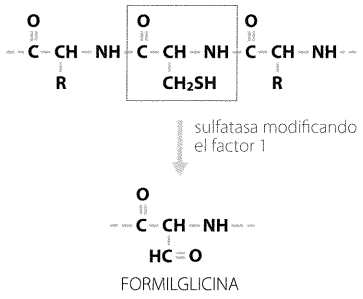


Figura 8.12 – El sitio activo de muchas sulfatasas requiere una modificación post-traduccional, la transformación de una cisteína en una formil-glicina mediante la enzima SUMF. La pérdida de función de SUMF produce la deficiencia múltiple de sulfatasas.

- Los pacientes con **mucolipidosis II (OMIM 252500)** tienen un enanismo desproporcionado, una cara tosca y retraso mental, similar a los que padecen síndrome de Hurler (OMIM 607014). Ambas enfermedades están relacionadas con defectos en enzimas lisosomales, pero mientras el síndrome de Hurler está causado por la pérdida de función de una enzima lisosomal específica, la α-l-iduronidasa, los lisosomas en pacientes con ML II (también conocida como enfermedad de células-I) tienen deficiencias en una serie entera de enzimas. ML II es una de las familias de enfermedades deficientes de glicoproteína-carbohidrato. Las enzimas lisosomales requieren carbohidratos específicos como señal de lo que deben transportar a los lisosomas tras ser sintetizado en el citoplasma de la célula. En la ML II esta señal es defectuosa. Existe una ausencia casi completa de señalización lisosomal, y en cambio la mayoría de las enzimas lisosomales son secretadas al torrente sanguíneo. La señal consiste en N-acetilglucosamina-1-fosfato pegada a un azúcar tipo manosa; éste, a su vez, se adhiere por turno a las cadenas polipetídicas de muchas enzimas lisosomales. El defecto fundamental en ML II es en una única enzima, la transferasa necesaria para producir la señalización molecular (gen *GNPTAB*).
- La **deficiencia múltiple de sulfatasas (OMIM 272200)** combina las características de seis enfermedades mendelianas, cada una de las cuales se produce por una deficiencia en una enzima sulfatasa específica. Los ARNm de cada enzima individual parecen producirse con normalidad. Otra vez nos encontramos ante un defecto en el proceso post-translacional. Todas las enzimas afectadas tienen un aminoácido inusual, la formilglicina, formando parte de su sitio activo. Se produce por la modificación de un residuo de cisteína en la proteína tras ser sintetizada (*Figura 8.12*). La deficiencia múltiple de sulfatasas es el resultado de mutaciones de pérdida de función en el gen que codifica para el factor modificante de sulfatasas I (SUMF), enzima responsable de la modificación.

Cuadro 8.3

Incapacidad para producir vitamina C: un error innato universal en humanos

Si tomara la dieta de su perro o gato, podría desarrollar escorbuto a causa de la carencia de vitamina C. ¿Cómo se puede permanecer sano pese a no comer nunca limones? Esto quiere decir que casi todos los animales tienen las enzimas necesarias para sintetizar ácido ascórbico y no dependen de un aporte externo. Como excepción encontramos a los humanos y otros grandes primates, cerdos de guinea, murciélagos comedores de fruta y pájaros *Pycnonotus cafer*. Todas estas especies tienen una carencia de la enzima L-gulono-gamma-lactona oxidasa (GULO), que cataliza el último paso de la biosíntesis del ácido ascórbico. La versión humana de este gen, localizado en el cromosoma 8p21, es un pseudogen defectuoso con pérdida de exones y otras mutaciones, relativas al gen funcional *gulo* en ratones. Las células humanas transfectadas con el gen *gulo* de ratones producen su propio ácido ascórbico. Presumiblemente las especies deficientes tienen una dieta rica en fruta que no hace presión selectiva sobre las mutaciones de pérdida de función de *GULO*.

ác. D-glucurónico → ác. L-gulónico → L-gulonolactona —**X**→ 2-queto L-gulonolactona → ác. L-ascórbico

Biosíntesis de ácido ascórbico.
La reacción final no es enzimática y ocurre espontáneamente. **X** indica el bloqueo metabólico en humanos.

¿Una enzima, una enfermedad?

No existe una clara correspondencia uno a uno entre enzimas y enfermedades. No puedes tomar un cuadro de una ruta metabólica y escribir al lado de cada reacción la enfermedad que resultaría de un error innato en ese paso. Para empezar, cualquier enfermedad que resulta de un fallo en una ruta con múltiples pasos podría ser producida por un bloqueo en cualquier paso de la ruta. De este modo, varios errores innatos podrían producir la misma enfermedad. Es similar a la manera en la que los defectos en diferentes genes pueden producir pérdida de audición hereditaria. Algunas enzimas son prescindibles; quizá la carencia de un producto de la reacción no tienen efectos adversos obvios, o quizás hay otras rutas para lograr la misma función. De este modo, algunos defectos enzimáticos no producirían una enfermedad. La biosíntesis de vitamina C proporciona un ejemplo interesante; un error innato que todos los hombres tienen y solo se manifiesta en entornos excepcionales (*Cuadro 8.3*). En otros casos el resultado es un fenotipo claro, pero uno que no podemos clasificar como enfermedad. La intolerancia a la lactosa es un ejemplo (*Cuadro 8.4*). Finalmente, diferentes grados de deficiencia en una enzima pueden producir fenotipos lo bastante diferentes como para ser clasificados como enfermedades distintas (ver el ejemplo de la deficiencia de DTDST de más abajo).

Cuadro 8.4

Intolerancia a la lactosa: un polimorfismo metabólico común

Muchos adultos del norte de Europa tienen un rasgo dominante: persistencia hereditaria de lactasa intestinal. Esto hace que sean capaces de tolerar una dieta rica en leche. A la inversa, la mayoría de las personas del este de Asia y de regiones tropicales y subtropicales del mundo, interrumpen la producción de lactasa en la infancia temprana. Es bastante común que las personas que tienen carencia de lactasa intestinal sufran distensión abdominal, dolor y diarrea cuando beben leche fresca. Productos lácteos como el queso y el yogur contienen menos lactosa y causan problemas menores. De un lado a otro del mundo la correlación con la leche que se bebe es clara; por ejemplo, ciertas tribus nómadas de África (como los beduinos, y los beja de Sudán) que beben leche fresca tienen altos niveles de persistencia de lactasa intestinal, sin embargo, en la mayoría de las poblaciones de África no persiste.

La persistencia o no de la lactasa no es un error innato, sino un polimorfismo común: ambos estados son comunes entre las personas normales. El estado ancestral es la no persistencia, como observamos en la mayoría de los mamíferos. Evidentemente ha habido una selección poderosa para la variante persistente entre las poblaciones que toman leche en su alimentación diaria. Esto ha debido ocurrir en los últimos 9000 años, siendo uno de los cambios selectivos más fuertes en la historia humana reciente.

Se ha tratado de identificar la variante de ADN causante. Datos recientes apuntan a un polimorfismo C/T 14kb más arriba del codón de inicio del gen de la lactasa en el cromosoma 2q21. En un estudio de 236 individuos de cuatro poblaciones (finlandeses, franceses, americanos europeos y afroamericanos), cada individuo con uno o más alelos T era lactasa persistente, mientras que cada individuo homocigoto para el alelo C era no persistente. Esta variante es típica de la clase de variantes que muestran factores de susceptibilidad a enfermedades comunes *(Capítulo 13)*. Con frecuencia, las enfermedades mendelianas son por mutaciones que causan pérdidas o ganancias mayores de función de un gen, pero aquí tenemos un ejemplo de un cambio que modifica el tiempo de expresión de un gen sin afectar a la integridad del producto del mismo.

Correlaciones genotipo-fenotipo

La mayoría de los errores innatos implican mutaciones de pérdida de función, y como es frecuente el caso de mutaciones de pérdida de función, se suele hacer extensivo a la heterogeneidad alélica (ver *Capítulo 6*). Ya que los bioquímicos pueden medir la actividad enzimática cuantitativamente, los errores innatos son un campo prometedor para establecer las correlaciones genotipo–fenotipo. Podríamos esperar una mutación que cause una pérdida parcial de actividad de una enzima que dé lugar a una enfermedad más atenuada que en el caso de que la pérdida fuera total.

En muchos casos esta expectativa se cumple. La CAH lo ilustra. En un estudio (ver OMIM 201910) una pérdida total de actividad enzimática produce normalmente la forma de pérdida de sal; un 2% de actividad residual produce la forma simple virilizante, y un 10–20% de actividad produce las formas no clásicas. Sin embargo, como en muchos otros ejemplos, la correlación entre la actividad enzimática y el fenotipo dista mucho de ser perfecta. Las mutaciones en la enzima transportadora de sulfato proporcionan otro ejemplo. Los polisacáridos sulfatados de alto peso molecular son componentes importantes del tejido conectivo, y las mutaciones de pérdida de función en la enzima de la distrofia diastrófica transportadora de sulfato (*DTDST*) causa displasias esqueléticas. Se distinguen cuatro síndromes diferentes de displasias esqueléticas autosómicas recesivas, que comprenden distintos grupos clínicos, todos ellos causados por defectos en la DTDST. En orden ascendente de gravedad:

- Displasia múltiple epifisaria 4 (MED4, OMIM 226900)
- Displasia diastrófica (DTD, OMIM 222600)
- Atelosteogénesis tipo II (AOII, OMIM 256050)
- Acondrogénesis tipo 1B (ACG1B, OMIM 600972)

Se han descrito muchas mutaciones diferentes en el gen DTDST. Un interesante artículo de Karniski (2001) explora la relación existente entre la actividad enzimática y el fenotipo clínico.

Se midió la actividad enzimática en una serie de alelos mutantes descritos (*Figura 8.13*). La mayoría de los pacientes son heterocigotos compuestos, y es importante recordar que lo que ocurre en la fisiología es el conjunto del nivel de actividad proporcionada por los dos alelos del gen. Agrupando las mutaciones en actividad cero (0), baja (L) y media (M), Karniski presenta los siguientes genotipos en los pacientes:

Enfermedad	Genotipos observados en casos individuales
MED, DTD	M/M, L/L, L/L, M/0
AOII	L/0, L/0, L/0, M/0
ACG1B	0/0, 0/0, L/L, M/0

La conclusión general es que existe correlación entre genotipo y fenotipo, pero con mucha frecuencia es bastante pobre. Un artículo de Scriver y Waters (1999) describe por qué podría ocurrir esto.

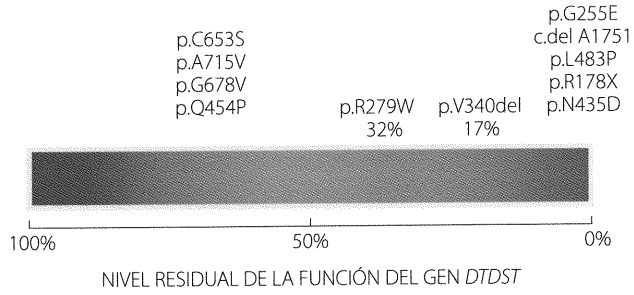


Figura 8.13 – Correlación genotipo–fenotipo en las displasias esqueléticas por la pérdida de función de la DTD transportadora de sulfato. Datos de Karniski (2001).

La fenilcetonuria (PKU, OMIM 261600) es un error innato causado por la pérdida de la fenilalanina hidroxilasa (encontramos un ejemplo en el *Capítulo 11*, Caso 22). La fenilalanina se acumula por encima del bloqueo y los elevados niveles de la misma dañan el desarrollo del cerebro. De este modo, el mayor problema clínico de la PKU es el retraso metal. Se han descrito múltiples mutaciones que dan lugar a grados de pérdida de función variables. La pregunta que se hacen Scriver y Waters es si se está lejos de predecir el coeficiente intelectual de un paciente conociendo la mutación que porta. La respuesta es que no se está lejos, y la *Figura 8.14* resume sus argumentos para explicar por qué esto es así (se recomienda la lectura del artículo).

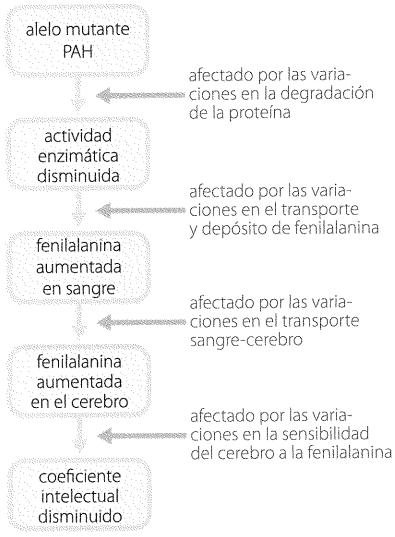


Figura 8.14 – En la fenilcetonuria muchos factores debilitan la correlación entre genotipo y fenotipo.
PAH: fenilalanina hidroxilasa; Esta figura resume los argumentos de Scriver y Waters (1999).

Farmacogenética

El Caso 20 (familia Tierney) y los ejemplos discutidos en la *Sección 8.2* conciernen a diferencias individuales en el metabolismo de fármacos (farmacocinética). Otro aspecto de la farmacogenética atañe a las variaciones en la acción primaria de un fármaco debido a la variación genética en las dianas con las que interactúa (farmacodinámica). Los polimorfismos naturales en las dianas de los medicamentos también pueden producir diferencias individuales en la respuesta a las mismas. Ahora los fármacos pueden ser diseñados para tratar genotipos específicos. Son ejemplos bien conocidos la Herceptina y el Gleevec.

- La Herceptina (trastuzumab) es un anticuerpo monoclonal frente a la proteína HER2 (ERBB2). Muchos cánceres de mama sobreexpresan este receptor de superficie, ya que uno de los cambios genéticos que ocurren durante la tumorigénesis es la amplificación de este gen. Estos cánceres responden a la Herceptina, pero los cánceres de mama que no sobreexpresan HER2 no lo hacen.
- El Gleevec (imitanib) es una pequeña molécula que inhibe una proteína quinasa anormal, la proteína de fusión Bcr–Abl. Esta proteína es producida de forma específica en la leucemia mieloide crónica como consecuencia del reordenamiento cromosómico que da lugar al gen de fusión *Bcr–Abl* (ver *Capítulo 12*). Ya que la acción de la proteína Bcr–Abl es crucial para el desarrollo de la enfermedad, Gleevec es un fármaco extraordinariamente efectivo que induce remisión completa en la gran mayoría de los pacientes.

Es probable que se desarrollen otros fármacos genotipo-específicos en los próximos años. Esto podría ser polémico. En Junio de 2005 la FDA aprobó la comercialización de la combinación farmacológica BiDil como tratamiento para fallos cardíacos severos en pacientes afroamericanos. La combinación de medicamentos es apropiada para las personas con bajos niveles vasculares de óxido nítrico. Esta enfermedad es más común en afroamericanos que en caucasianos; la identidad étnica es utilizada aquí como un indicador grosero de genotipo. El archivo BiDil (ver *Referencias*) da acceso al debate que rodeó esta decisión.

Pese a todo lo que se ha hablado sobre la medicina personalizada, es llamativo que estemos bastante lejos de aplicación práctica de los análisis genéticos para recetar. Una de las razones por las que ocurre esto es que las compañías farmaceúticas tratan de diseñar fármacos que no sean metabolizados por el sistema P450, y que no se vean afectados por otras causas comunes bien conocidas de variación en la farmacocinética. Así, las principales dianas para el análisis farmacogenético serán medicamentos establecidos, la mayoría de los cuales están ahora fuera de la protección de las patentes. La industria tiene pocos incentivos para desarrollar y comercializar los análisis de fármacos que no producen mucho dinero.

Un segundo problema es el escaso entendimiento de los factores genéticos que dan lugar a múltiples variaciones. Podemos ilustrarlo con dos ejemplos:

- La hipertermia maligna (MH) es una enfermedad autosómica recesiva (ver OMIM 145600) que es una respuesta a los anestésicos, implicando una grave amenaza para la vida. Algunos pacientes con MH tienen mutaciones en el gen receptor de la ryanodina, pero otros no. Un análisis de ligamiento ha sugerido la existencia de, al menos, cinco loci de MH. De este modo, cuando alguien tiene una historia familiar de MH, antes de someterse al riesgo de una anestesia general, debe realizarse un análisis fenotípico (test de contracción *in vitro* utilizando una muestra de músculo biopsiado), antes que un test genético.
- La enzima CYP3A4 es la enzima P450 más abundante en el hígado y participa en el metabolismo de alrededor de la mitad de todos los fármacos prescritos (ver OMIM 124010). La actividad enzimática del hígado puede variar de 1 a 30 veces entre los distintos individuos. Sin embargo, muy poca de esta variabilidad se ha atribuido a variantes en la secuencia codificante del gen *CYP3A4*. Gran parte de la variación bien podría ser genética, pero debe encontrarse en factores no identificados que controlan la expresión de CYP3A4.

Aun cuando se entiendan los mecanismos genéticos, los genotipos pueden no ser lo suficientemente predictivos. El anticoagulante warfarina ilustra esta complejidad. La warfarina es ampliamente prescrita para personas que tienen enfermedades coronarias o trombosis venosa, especialmente tras cirugía. Su diana es la vitamina K epóxido reductasa codificada por el gen *VKORC1*, y metabolizada por la enzima CYP2C9 P450 (ver *Figura 8.6*). Los individuos con variantes de baja actividad de CYP2C9 y/u otras variantes de *VKORC1* tienen riesgo de episodios graves de sangrado cuando se les da una dosis estándar de warfarina. Sin embargo, muchos otros factores también afectan a

la respuesta de la persona. Entre estos están la edad del paciente, la presencia de otras enfermedades y la interacción con otros fármacos. De este modo, la práctica común es comenzar con una dosis baja de warfarina e ir aumentándola gradualmente hasta obtener el grado deseado de anticoagulación. Incluso aunque se estudiaran previamente los genotipos de *CYP2C9* y *VKORC1*, sería prudente seguir este protocolo.

El problema final es la logística de la incorporación del análisis genético en la práctica clínica de rutina. Todos estos problemas podrían cambiar con la introducción de los microarrays que pueden identificar rápidamente un gran número de factores genéticos relevantes. Si esto se pudiera conseguir de una forma útil y económica, la medicina personalizada se convertiría en una realidad en la práctica clínica del día a día. Por último, sería posible desarrollar un único análisis de microarray, una vez en la vida, que podría ser útil en la predicción de la reacción de una persona ante toda una serie de fármacos. Los datos de este análisis pasarían a formar parte de la historia médica de esa persona.

Inmunogenética

En la *Sección 8.2* hemos mencionado dos aspectos desafiantes de la inmunogenética: cómo los antígenos son reconocidos como propios o extraños, y cómo se produce una infinita diversidad de moléculas de anticuerpos. El papel del MHC en el reconocimiento está descrito más arriba; aquí discutiremos los mecanismos genéticos más notables que dan lugar a la diversidad de anticuerpos.

Los anticuerpos son proteínas (inmunoglobulinas, Ig) compuestas por cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras. Éstas deben ser ensambladas de distintas maneras para producir las diferentes clases de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM. Cada clase tiene una cadena pesada específica y preferencia por cadenas ligeras κ o λ. Los cinco tipos de cadenas pesadas son codificadas en el locus *IGH* en el cromosoma 14, y las cadenas ligeras en los loci *IGK* o *IGL* en los cromosomas 2 y 22, respectivamente. Cada uno de esos loci, sin embargo, contienen un gran grupo de posibles secuencias codificantes (*Figura 8.15*). La parte C-terminal de cada cadena Ig de una clase dada es constante, pero la parte N-terminal, que porta el sitio de unión al antígeno, es altamente variable. Los genes de inmunoglobulinas maduras tienen una estructura multi-exón convencional, con un único exón codificante de la región variable N-terminal y múltiples exones que codifican para la región constante. Sin embargo, el exón que codifica la región variable es el resultado de una gran variabilidad de reordenamientos del ADN durante la maduración de la célula B.

Como se explica en la leyenda de la *Figura 8.15*, la secuencia que codifica cada región variable se forma uniendo un segmento V (variable), J (de unión) y (para las cadenas pesadas) D (diversidad), cada uno elegido de una serie de alternativas. No confundir este proceso con el *splicing* (corte y empalme) de exones e intrones. Los exones e intrones sufren el *splicing* en la trancripción del ARN por el spliceosoma (*Capítulo 3*). Los genes Ig sufren el *splicing* a nivel del ADN específicamente en los linfocitos B. El producto es un gen con múltiples exones cuyo tránscrito primario sufre *splicing* de la manera habitual.

La diversidad total de anticuerpos depende de varios mecanismos adicionales.

- A diferencia de la recombinación genética convencional, el mecanismo especializado de unión de segmentos V, D y J suma o resta aleatoriamente un pequeño número de nucleótidos en los empalmes. Donde el resultado producido es un *frameshift* (cambio de marco de lectura), el gen reordenado no es funcional, pero en la tercera parte de los casos donde el marco de lectura se conserva, se crea una diversidad extra.
- Tras completar el reordenamiento génico, un proceso somático de hipermutación introduce mutaciones puntuales al azar de alta frecuencia en la región variable de los genes en células B activadas.
- Las diferentes clases de cadenas pesadas en IgA, IgD, IgE, IgG e IgM han sido producidas por otro mecanismo especializado de recombinación. Cada gen IgH reordenado tiene secuencias codificantes en 3' para cada uno de los cinco tipos de regiones constantes (solo se muestra Cμ en la *Figura 8.15*; las demás se encuentran más abajo de ésta). Solo se utiliza la secuencia C cercana al exón VDJ. El cambio de clase ocurre mediante un evento de recombinación intramolecular que escinde físicamente una o más secuencias C; esta diferencia va a dar lugar a que encontremos una u otra secuencia adyacente a la secuencia VDJ.
- Finalmente, la combinación de la cadena pesada y la ligera en una molécula de anticuerpo va a dar lugar a otra fuente de diversidad combinatorial.

Solo queda añadir que en el gen que codifica para el receptor de las células T opera un mecanismo similar de generación de diversidad. Para conocer todos estos procesos en mayor detalle, consulta un texto de inmunología, como Janeway *et al.* (2001, ver *Referencias*).

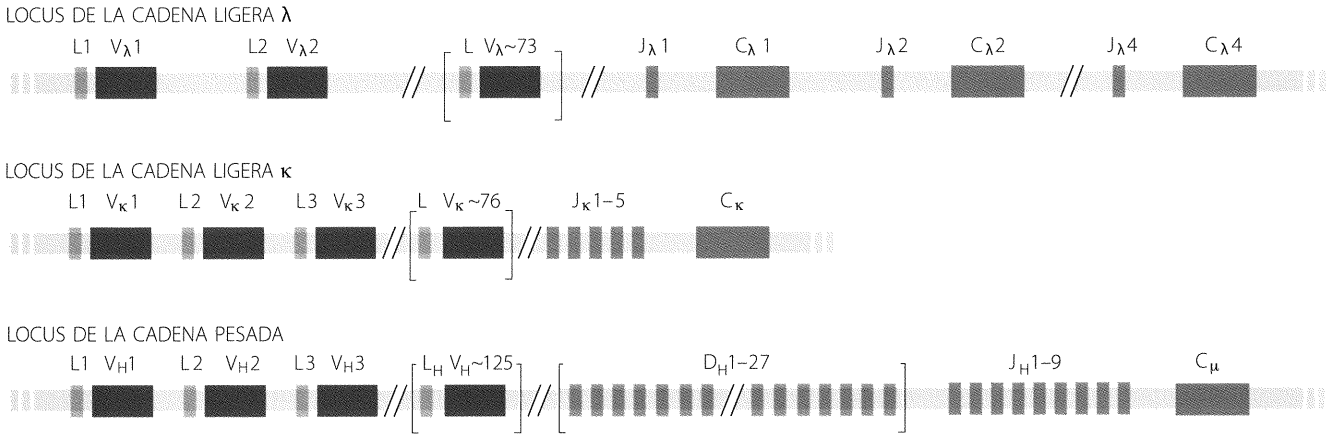


Figura 8.15 – Cada tipo de gen de inmunoglobulina es producido por reordenamientos del ADN que ocurren específicamente en los linfocitos B.
En las cadenas ligeras una de las 73 regiones (λ) o 76 (κ) V se une a una de las 5–11 regiones J, dando lugar a 365–836 combinaciones. En las cadenas pesadas una de las 27 regiones D se une a una de las nueve regiones J, y la nueva secuencia se une entonces con una de las 125 regiones V, dando lugar a alrededor de 30.000 combinaciones. Esta diversidad combinatorial es solo una de las formas en las que las células B son capaces de producir casi una diversidad infinita de inmunoglobulinas. Modificado de Janeway *et al.* (2001) con el permiso de Garland Science.

Cuadro de enfermedad 8

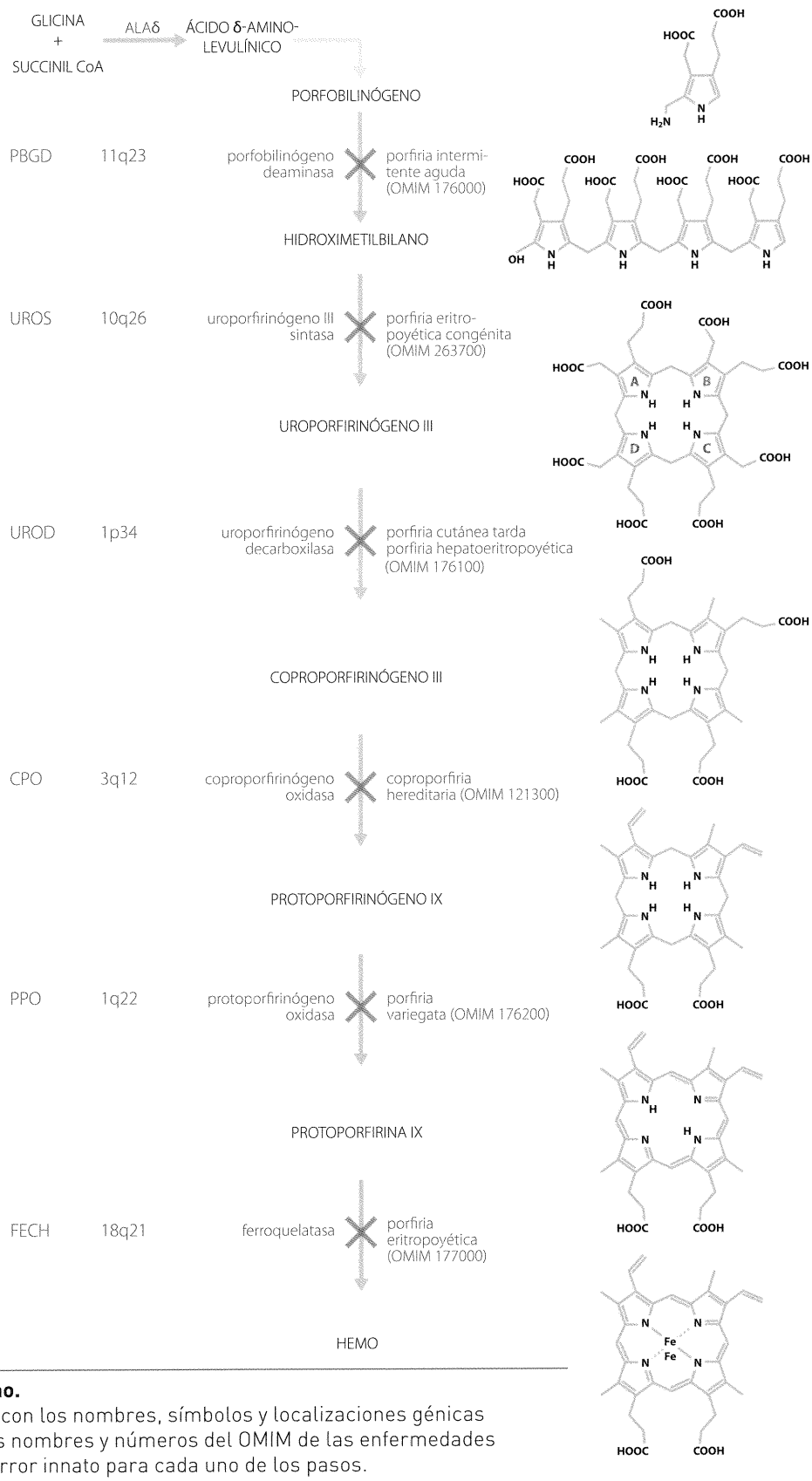
Las porfirias

Las porfirias son una familia de enfermedades causadas por alteraciones en la biosíntesis del hemo. Una ausencia completa de hemo sería letal, y todas las porfirias son causadas por alteraciones de biosíntesis que están cerca del fallo total. El primer paso específico en la biosíntesis del hemo es la síntesis del ácido δ-amino levulínico a partir de glicina y succinil CoA (ver figura), catalizada por la ácido δ-amino levulínico sintasa (ALAS). Este es el paso determinante para toda la ruta. Se conocen defectos enzimáticos específicos que producen porfiria para cada uno de los seis pasos subsiguientes.

Todas las porfirias dan como resultado la circulación y excreción de varias porfirinas anormales debido a la acumulación de intermediarios del proceso de síntesis antes del bloqueo metabólico. Son estos intermediarios más que la deficiencia de hemo los que causan los problemas clínicos. Todas las porfirias están marcadas por síntomas cutáneos y/o neurovisceral es. Los problemas cutáneos son causados por el depósito de la porfirina no fisiológica, uroporfirina I, la cual es un componente fotosensible. Los pacientes con porfiria aguda intermitente, porfiria variegada o coproporfiria son sanos, pero factores ambientales, hormonales o metabólicos pueden precipitar un ataque de la enfermedad. Cualquier cosa que induzca la actividad hepática ALAS puede sobrecargar la ruta sintética comprometida y dar lugar a intermediarios patogénicos. Los factores precipitantes incluyen al alcohol y muchos medicamentos. Durante un ataque, el paciente sufre dolor gástrico severo y, en ocasiones, alteraciones psicológicas; pero entre los ataques se encuentran sanos (la razón sexual de los ataques es 5M:1V). Podría ser significativo el que las porfirinas actúan como ligandos para algunos receptores de benzodiacepinas. Se ha sugerido que varias figuras históricas "dementes", incluyendo a Vincent van Gogh y el rey británico Jorge III, podrían haber padecido porfiria.

Existen varios puntos de interés genético en las porfirias.

- Como es común en los organismos superiores, los genes codificantes de enzimas funcionalmente relacionadas no están organizados en un operón, como en las bacterias, sino que están dispersos en los diferentes cromosomas.
- La mayoría de las porfirias son dominantes, pero la variedad y la naturaleza de mutaciones descritas (ver las entradas relevantes en OMIM) pone de manifiesto que estos cambios de pérdida de función y, por tanto, la patología, es debida a la haplo-insuficiencia. La enfermedad recesiva, porfiria eritripoyética congénita, está asociada a una pérdida parcial de función de la enzima afecta. La gravedad clínica de la porfiria eritripoyética congénita se correlaciona bastante bien con la actividad enzimática residual; niveles muy bajos causan hidrops fetal.
- La porfiria cutánea tarda es la forma más frecuente de porfiria pero solo el 20% de los casos tienen un origen genético. Existen múltiples desencadenantes ambientales, especialmente el alcohol, y la susceptibilidad aumenta en las personas portadoras de mutaciones del gen *HFE* asociadas a la hemocromatosis (ver OMIM 235200).
- La protoporfiria eritropoyética parece ser dominante, pero muchos portadores de un único alelo no funcional *FECH* permanecen sanos. El 35% de la actividad enzimática normal es suficiente para evitar la enfermedad, así que, ¿por qué las personas afectas por esta enfermedad dominante tiene menos del 50% de actividad normal de ferroquelatasa? Una explicación podría ser un efecto negativo dominante (ver *Sección 6.4*). Sin embargo, personas con la misma mutación *FECH* pueden estar tanto sanas como afectas, así que esta explicación no es correcta.



Biosíntesis del hemo.
Se muestra la ruta, con los nombres, símbolos y localizaciones génicas de los enzimas, y los nombres y números del OMIM de las enfermedades producidas por un error innato para cada uno de los pasos.

Cuadro de enfermedad 8

El resultado es que casi todos los pacientes son heterocigotos compuestos para un alelo raro no funcional y un alelo común parcialmente funcional. Una sustitución de un único nucleótido T>C en 48 nucleótidos del 3' del exón 3 del gen *FECH* (SNP rs2272783) está muy extendida en varias poblaciones (japonesa 43%, sudeste asiático 31%, franceses blancos 11%), pero rara en otras (población negra del oeste africano <1%). La frecuencia de SNP en diferentes poblaciones correlaciona con la frecuencia de protoporfiria eritropoyética. Este polimorfismo afecta a la eficiencia de *splicing*. La mayoría del ARN producido por el alelo C sufre un *splicing* aberrante y analizado por degradación mediada por mutaciones terminadoras (NMD) (ver *Capítulo 6*). Tal mecanismo podría, quizás, explicar algo de la variabilidad de otros fenotipos dominantes.

8.5. Referencias

Buckley RH (2004) Molecular defects in human severe combined immunodeficiency disease and approaches to immune reconstitution. *Ann. Rev. Immunol.* **22**: 625–655.

Evans WE y McLeod HL (2003) Pharmacogenomics: drug disposition, drug targets and side effects. *New Engl. J. Med.* **348**: 538–549. *Acceso gratuito al texto en* http://content.nejm.org/cgi/content/extract/348/6/538.

Horton R, Wilming L, Rand V, *et al.* (2004) Gene map of the extended human MHC. *Nat. Rev. Genet.* **5**: 889–899.

Janeway CA, Travers P, Walport M y Shlomchik M (2001) *Immunobiology*, 5th edn. Garland Science, New York. *Disponible en el NCBI Bookshelf* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books.

Karniski LP (2001) Mutations in the diastrophic dysplasia sulfate transporter (DTDST) gene: correlation between sulfate transport activity and chondrodysplasia phenotype. *Hum. Molec. Genet.* **10**: 1485–1490.

McLeod HL y Siva C (2002) The thiopurine S-methyltransferase gene locus – implications for clinical pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*, **3**: 89–98.

Scriver C y Waters PJ (1999) Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet.* **15**: 267–272. *Lectura muy recomendable.*

Service RF (2005) Going from genome to pill. *Science*, **308**: 1858–1860.

Weinshilboum R (2005) Inheritance and drug response. *New Engl. J. Med.* **348**: 529–537. *Acceso gratuito al texto en* http://content.nejm.org/cgi/content/extract/348/6/529.

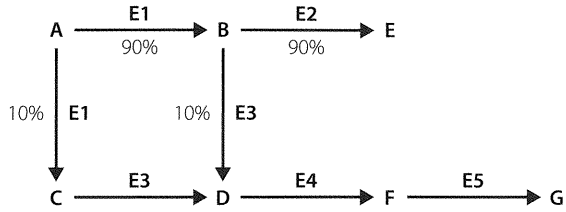
Páginas web útiles

Archivo BiDil: http://www.nottingham.ac.uk/igbis/reg/bidil.htm

Medicinas personalizadas: esperanzas y realidades, un informe de la Royal Society 2005: http://www.royalsoc.ac.uk/displaypagedoc.asp?id=17570

8.6 Ejercicios de autoevaluación

(1) El diagrama muestra la ruta biosintética que lleva desde el precursor A a los productos E y G. Las enzimas E1-E5 catalizan las reacciones. E1 transforma el 90% de A en B y el 10% en C. El 90% de B es convertido normalmente en E por E2, pero el 10% es transformado en D mediante E3. ¿Qué enzima/s podría ser deficiente en una enfermedad definida por (a) deficiencia de E y G, (b) deficiencia solo de G, y (c) deficiencia de E junto a incremento en la cantidad de G?



(2) Describa las vías por las cuales una enfermedad mendeliana podría ser el resultado de la pérdida de función de varias enzimas si (a) cada paciente de un grupo no relacionado muestra pérdida de función en solo una de las enzimas, diferente en cada paciente y, (b) si cada paciente muestra pérdida de función de todas las enzimas.

(3) La porfiria aguda intermitente es una enfermedad dominante; a pesar de ello se estima que el 80% de las personas heterocigotos para la mutación patogénica *PBGD* viven ignorantes de este hecho y nunca sufren un episodio de la enfermedad. Discuta las posibles causas de esta baja penetrancia.

(4) Discuta el caso considerando el escorbuto como una enfermedad genética. ¿Pueden ser aplicados argumentos similares a otros ejemplos?

(5) Arthur, Bridget y sus tres hijos, Charles, Daniel y Eliza, fueron tipados para los loci HLA-A, -B y -DR. Los resultados fueron (utilizando nomenclatura simplificada):

Arthur	A3,23;	B7,27;	DR3,4
Bridget	A2,23;	B15,27;	DR3,4
Charles	A3,23;	B15,27;	DR3,4
Daniel	A2,23;	B7,27;	DR3,4
Eliza	A2,3;	B27;	DR4

Asumiendo que no existe recombinación y los alelos A, B y DR de cada persona han sido transmitidos como un haplotipo intacto, elabore los haplotipos de esta familia.

(6) ¿Qué características del locus del gen o del espectro mutacional de una enfermedad podrían llevarle a sospechar que la conversión génica podría ser el mecanismo mutacional principal?

(7) ¿Cuáles son los posibles genotipos de las muestras mostradas en los pocillos 6, 8 y 9 de los dos geles de la *Figura 8.8*?

Capítulo **9**

¿Cómo se identifican los genes de las enfermedades mendelianas?

Conceptos y habilidades que aprenderá en este capítulo

Después de estudiar este capítulo será capaz de:

- Describir los principios del mapeo genético en humanos.
- Identificar recombinantes y no recombinantes en un árbol genealógico.
- Describir el uso de microsatélites y SNPs como marcadores genéticos.
- Describir las diferentes rutas por las que han sido identificados los genes de las enfermedades humanas.
- Mostrar cómo pueden ser utilizadas las bases de datos del Proyecto Genoma Humano para solucionar problemas clínicos.
- Mostrar cómo pueden servir los marcadores de ligamiento para seguir un gen de una enfermedad a lo largo de todo el árbol genealógico.

9.1. Historias clínicas

Aunque esta enfermedad (OMIM 127400) es rara y no especialmente difícil a nivel clínico, la hemos elegido porque todos los pasos en las rutas estándar de identificación de un gen están descritos en un artículo que es accesible a todo tipo de lectores (Miyamura *et al.*, 2003). Debido a que se trata de familias reales, hemos intentado no inventar una historia clínica.

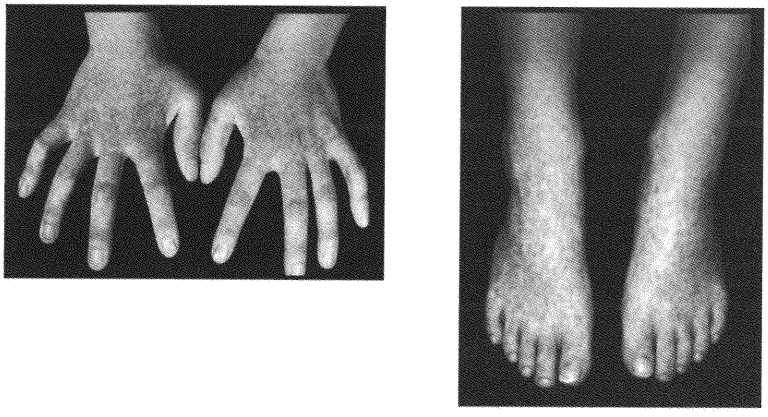


Figura 9.1 – Discromatosis simétrica hereditaria.
Los pacientes con DSH tienen pequeñas máculas hiperpigmentadas e hipopigmentadas en el reverso de las manos y en la superficie dorsal del pie. Estas anomalías son asintomáticas y no afectan al estado de salud general de una persona. La enfermedad es autosómica dominante. Fotos cortesía de los doctores Tamio Suzuki y Yasushi Tomita, Universidad de Nagoya.

9.2. Antecedentes

Los genes se pueden definir de dos formas muy diferentes:

- Como determinantes de caracteres mendelianos ("el gen de la enfermedad de Huntington", etc.)
- Como unidades funcionales del ADN

Los dos se deben corresponder en última instancia, y en este capítulo veremos cómo las parejas correspondientes son identificadas. El Proyecto Genoma Humano y las iniciativas asociadas están proporcionando un buen catálogo de genes como unidades funcionales del ADN. De cada gen conocemos la localización física exacta, medido en pares de bases de ADN desde el extremo de un cromosoma. El catálogo aún no está completo: genes cuyo producto es un ARN que no se traduce y que están bajo represión, y detalles de muchos de los genes que codifican proteínas están todavía incompletos. Sin embargo, la lista actual y los mapas físicos asociados son un recurso enorme.

Pero, conocer la secuencia del genoma humano no nos dice por sí solo nada sobre el gen de la enfermedad de Huntington: ni su secuencia de ADN ni su localización cromosómica. Los genes que están definidos a través de su fenotipo tienen que ser identificados utilizando diferentes métodos. Una vez identificados, casi siempre terminan siendo genes que habían sido definidos como unidades de ADN, pero será imposible decir por adelantado qué unidad funcional del ADN es la correcta. El mayor logro de la genética clínica entre 1985 y 2000 ha sido identificar los genes correspondientes a la gran mayoría de enfermedades mendelianas y realizar conexiones entre los rasgos y las secuencias de ADN.

Hay varias maneras de identificar estos genes:

- Si se conoce la secuencia proteica del producto de un gen, se puede resolver su secuencia ADNc leyendo la tabla de código genético. Se puede sintetizar una sonda de oligonucleótidos correspondiente a la secuencia, y utilizarla para analizar una librería de ADNc y extraer un clon que contenga el ADNc (ver *Cuadro 9.1*)
- Si se ha descubierto un miembro de una familia de genes que causa cierta enfermedad, los otros miembros de la misma familia son candidatos para enfermedades relacionadas. Por ejemplo, después de que se descubriera que el gen de la fibrillina estaba mutado en el síndrome de Marfan (ver *Caso 10*, familia Jonson) un gen relacionado, la fibrillina 2, era un buen candidato para una enfermedad relacionada, contractura congénita con aracnodactilia (OMIM 121050).
- Si el gen causa un fenotipo en animales, su homólogo humano es candidato para una enfermedad humana similar. Se descubrió que el *Sox10* causaba la mutación *megacolon dominante* en ratones. Su homólogo humano el *SOX10* se convirtió, por tanto, en candidato para un síndrome similar de humanos: el síndrome de Waardenburg Tipo IV (OMIM 277580).
- Si el producto del gen es parte de una vía de desarrollo, regulación o metabólica, y ese gen está mutado en algunas personas, pero no en todas las que tienen una enfermedad, otros genes de la misma vía serán candidatos para los casos restantes. Como ejemplo, el caso del *CDKL5* en el síndrome de Rett en el *Cuadro de enfermedad 7.*

- Si la enfermedad muestra anticipación (esto es, en cada generación sucesiva se vuelve más grave o la edad de inicio es más temprana; ver *Cuadro de enfermedad 4*) puede estar originada por una expansión inestable de repeticiones de ADN. Hay técnicas para analizar de manera directa el ADN del paciente en busca de estas expansiones de repeticiones. Si se descubre una expansión en un gen particular, el ADN de otros pacientes puede ser analizado en busca de la misma expansión.

Sin embargo, ninguno de estos métodos puede ser aplicado de manera general para cualquier enfermedad mendeliana. En cualquier caso, debido a que las correlaciones genotipo-fenotipo son generalmente pobres y difíciles de predecir, la probabilidad de que las predicciones genotipo-fenotipo den con el gen correcto no es alta. Antes de invertir mucho esfuerzo en la búsqueda de mutaciones, muchos investigadores buscan confirmaciones extra para estar seguros de que están buscando en el sitio correcto. Esta confirmación les viene del mapeo del rasgo.

Así, la ruta estándar por la que la gran mayoría de genes correspondientes a los rasgos mendelianos que han sido identificados, comienza con un mapeo del rasgo para revelar su localización cromosómica. En los tiempos de la pre-genómica, una vez que se conocía la localización se hacía necesario clonar todo el ADN de la región candidata, identificar cada gen de la región y buscar en cada uno de ellos mutaciones en individuos afectos. Esta aproximación se denomina **clonaje**

Cuadro 9.1

Identificación de genes a través de su proteína producto

Esta era la ruta utilizada con algunos de los primeros genes de enfermedad identificados con éxito. Hasta finales de los setenta, el número de técnicas para extraer y caracterizar proteínas superaba al número de aquellas que servían para extraer y caracterizar el ADN humano. Ejemplos:

- *Los genes de la α y β globina* están dentro de los tres primeros genes humanos que fueron clonados basándose en el conocimiento de que la mayor parte de las proteínas sintetizadas por los precursores de células rojas eran las dos cadenas de globina.
- El *Factor VIII* fue identificado en 1984 a través de la información de la proteína que codificaba. Se sabía que la hemofilia A estaba causada por la falta del factor de coagulación sanguíneo VIII. Se aisló una cantidad suficiente de proteína Factor VIII de la sangre de cerdo que permitió obtener la secuencia parcial de aminoácidos, que fue utilizada para predecir la secuencia de ARNm codificante de esas partes de la proteína, leyendo de manera inversa su código genético. La predicción contenía muchas ambigüedades; por ejemplo, el aminoácido serina puede estar codificado por cualquiera de seis codones diferentes. En el otro extremo, el triptófano y la metionina solo tienen un codón. Se eligió un grupo de 15 animoácidos para minimizar las ambigüedades, y se sintetizó una mezcla de oligonucleótidos que incluía todas las secuencias codificantes de los 15 aminoácidos. Esta mezcla se utilizó como sonda para hallar la secuencia con la que encajaba en una librería de ADN genómico de cerdo. Una vez aislado el gen *F8* de cerdo, el clon de cerdo fue utilizado para identificar el gen *F8* humano realizando una búsqueda en una librería humana.

Las modernas técnicas proteómicas pueden, de una sola vez, realizar la identificación de un gen que causa una enfermedad a través del estudio de los cambios en un repertorio de proteínas.

posicional y resultaba una empresa heroica. Hoy en día, en la era de la post-genómica, todo es mucho más sencillo. Una vez mapeado el gen, extraemos de las bases de datos una lista de los genes de las localizaciones, se eligen los posibles candidatos y se realiza la búsqueda de mutaciones. Con frecuencia se denomina aproximación del **candidato posicional.**

A partir de ahora consideraremos cómo se pueden mapear los genes causantes de los fenotipos humanos y, luego, cómo el gen correcto puede ser identificado en de la región candidata. En la *Sección 9.3* veremos las etapas de un ejemplo del método de candidato posicional: la identificación del gen causante de DSH.

Fundamentos del mapeo de genes

Todo el mapeo génico depende del comportamiento de los cromosomas durante la meiosis (*Figura 2.7*). Los cromosomas no homólogos se clasifican de manera independiente. Esto significa que los alelos de loci en diferentes cromosomas tienen una probabilidad del 50% de terminar en el mismo gameto (no recombinantes) y un 50% de probabilidad de terminar en diferentes gametos (recombinantes). Los loci que están en el mismo cromosoma viajan juntos, a menos que un entrecruzamiento entre los cromosomas homólogos emparejados los separe (*Figura 9.2*). Se separarán si el entrecruzamiento ocurre en la posición entre dos loci. Esto ocurrirá a menudo entre loci que estén muy separados, pero solo en raras ocasiones en aquellos que están cercanos. Así, la probabilidad de recombinación entre dos loci puede ser medida por la distancia que hay entre ellos. Se define que los loci separados por recombinación en un 1% de las meiosis están separados en 1 centiMorgan (cM).

Las distancias genéticas, definidas de esta manera y medidas en centiMorgans, no son iguales a las medidas físicas, medidas en pb, kb o Mb de ADN. Las dos se corresponderían de manera exacta solo si la probabilidad de entrecruzamiento fuera igual en cada trozo de un cromosoma. De hecho, algunas regiones tienen una frecuencia de entrecruzamiento mayor a otras. El orden de los loci en los mapas genéticos y físicos debe seguir siendo igual, pero el espaciamiento puede ser diferente. Como regla general se puede aceptar que 1 cM se corresponde con 1 Mb, pero hay variaciones locales considerables.

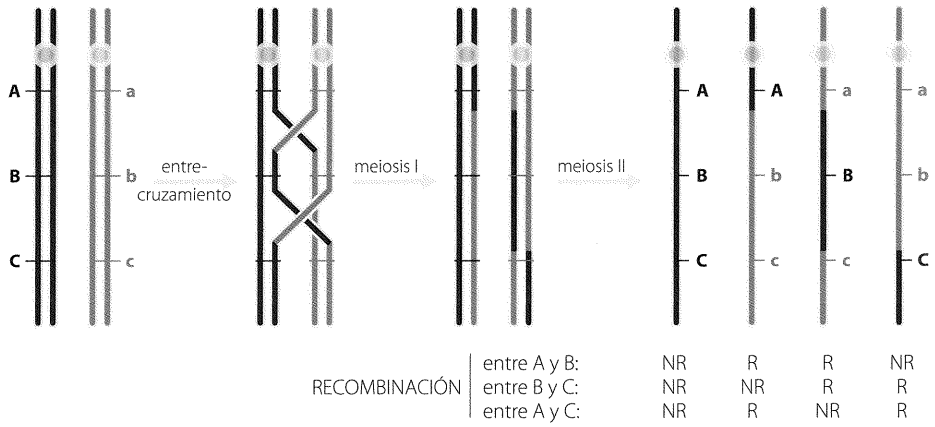


Figura 9.2 – El entrecruzamiento entre pares de cromosomas homólogos en la primera división meiótica da lugar a recombinación entre loci genéticos. Ejemplo de los efectos de dos entrecruzamientos entre loci A, B y C, que implican a tres de las cuatro cromátidas. Los entrecruzamientos dobles pueden implicar a dos, tres o las cuatro cadenas. NR, no recombinante para este par de loci; R, recombinante para este par de loci.

El mapeo genético depende del estudio de dos (o más) loci en un grupo de meiosis independientes y estimando la proporción de meiosis en las que ha habido recombinación entre ellos. Si la fracción de recombinación está por debajo del 50%, se dice que los loci están ligados, y deben estar en el mismo cromosoma. Los loci no ligados deben estar en diferentes cromosomas o pueden estar en el mismo cromosoma pero separados el uno del otro. Estudiar series de loci ligados y estimar fracciones de emparejamiento de recombinación permite que los loci se coloquen en orden a lo largo de un mapa genético (*Figura 9.3*). La figura muestra un experimento de cría de moscas del vinagre, el organismo en el que TH Morgan entre los años 1910-1920 desarrolló los conceptos del mapeo genético. Experimentos como estos establecieron la metodología del mapeo genético; aplicar conceptos a los humanos requiere métodos estadísticos complejos.

Se estudiaron tres caracteres recesivos:

Bermellón (v)	vs. Ojos normales (rojo, v^+)
Alas arrugadas (cv)	vs. Alas normales (c, v^+)
Alas cortas (ct)	vs. Borde de las alas normales (ct^+)

Las moscas disponibles eran:

Ojos rojos, alas arrugadas y cortas (v^+/ v^+, cv/cv, ct/ct)
Ojos bermellón, alas normales (v/v, cv^+/cv^+, ct^+/ ct^+)

(a) Líneas producidas para los experimentos de mapeo:
Triple recesiva v/v, cv/cv, ct/ct con ojos bermellón, alas arrugadas y cortas
Triple heterocigotas v/ v^+, cv/ cv^+, ct/ ct^+

(b) Se cruzaron las triples heterocigotas con moscas homocigotas recesivas para los tres caracteres y se fenotipa la descendencia:
El progenitor macho contribuía a los tres alelos recesivos, por lo que el fenotipo de cada mosca progenitor daba una lectura directa del genotipo del gameto materno que producía.

(c) Se calcula la fracción de recombinación de cada par de loci recombinantes:
Los gametos eran recombinantes si contenían una combinación de alelos diferentes de la combinación paterna (v^+, cv, ct) y (v, cv^+, ct^+); véase la manera en que se consiguieron los triple heterocigotos femeninos.

v	v^+	ct^+	580	no recombinantes ($n = 1172$)
v^+	cv	ct	592	
v	cv	ct^+	45	recombinantes entre loci (v, ct) y cv (n=85)
v^+	cv^+	ct	40	
v	cv	ct	89	recombinantes entre loci v y (cv, ct) (n=183)
v^+	cv^+	ct^+	94	
v	cv^+	ct	3	recombinantes entre loci (v, cv) y ct (n=8)
v^+	cv	ct	5	
			1488	

Tenga en cuenta que solo 316 de los 1488 gametos (21%) son recombinantes. Claramente los tres loci están ligados.

(d) La combinación de los datos establece el orden y las distancias genéticas de los loci:
El fenotipo más raro debe ser aquel que requiere una doble recombinación para que se produzca. Esto establece que el orden de los genes debe ser v – ct – cv.

Después, contamos los recombinantes de cada intervalo:

Entre v y ct:	183 + 8	= 191/1488 = 13,2%
Entre ct y cv:	85 + 8	= 93/1488 = 6,4%
Entre v y cv:	183 + 85 + (2 × 8)	= 284/1488 = 19,6%

El mapa que establece este experimento es v – 13.2 cM – ct – 6.4 cM – cv.

Figura 9.3 – Mapeo genético en *Drosophila* (la mosca del vinagre).
Las distancias son distancias genéticas, medidas en centiMorgans (cM). Datos de Griffiths *et al.* (1990).

Problemas especiales del mapeo genético en humanos

La necesidad de utilizar marcadores genéticos

El mapeo genético en humanos plantea la misma pregunta que la mosca del vinagre, pero el método que hay que usar tiene que estar adaptado a la familia tipo humana. El mapeo siempre estudia pares (o número mayores) de loci. Aunque cualquier meiosis puede implicar un entrecruzamiento entre los dos loci, solo podemos saber si ha sucedido o no, si el individuo en el que se ha producido la meiosis es heterocigoto para ambos loci. Con las moscas (*Figura 9.3*) se puede preparar el experimento para realizar el cruce apropiado. En humanos debemos tomar a las familias como nos las encontramos. La probabilidad de encontrar familias en las que dos enfermedades estén segregando, de tal forma que haya dobles heterocigotos, es muy baja. De hecho, buscamos familias en las que la enfermedad de interés se esté segregando y luego las tipificamos en busca de marcadores. Los marcadores tienen que tener cuatro propiedades:

- Tienen que ser heredados con un patrón claramente mendeliano.
- Tienen que ser lo suficientemente polimórficos para que exista una alta probabilidad de que una persona, elegida porque sea heterocigota para la enfermedad que estemos estudiando, sea también heterocigota para ese marcador.
- Debe ser razonablemente sencillo de tipificar, utilizando material que para los miembros de la familia sea fácil de aportar.
- Los marcadores deben estar disponibles a lo largo de todo el genoma en intervalos cercanos. Esto dependerá del material disponible. Si se pueden estudiar un número elevado de meiosis, se puede estudiar el genoma completo utilizando marcadores que estén separados 40 cM. Las colecciones de árboles genealógicos que sean válidos requieren marcadores de no más de 10 cM de separación. Esto se traduce en unos 300-500 marcadores.

En el pasado las tentativas de marcadores se hicieron utilizando los grupos sanguíneos, las variantes proteicas electroforéticas y los tipos de tejidos, pero cada uno fallaba en uno o más criterios de la lista. Solo los polimorfismos de ADN pueden satisfacer esos requerimientos. Se utilizan dos tipos (*Figura 9.4*):

- Los **microsatélites** son pequeñas repeticiones en tándem (por ejemplo, las secuencias $(CA)_n$) que están presentes en todas las personas y en las mismas localizaciones cromosómicas específicas, pero cuyo número de unidades de repetición varía de una persona. Las primeras fases del Proyecto Genoma Humano se dedicaron en gran parte a identificar microsatélites útiles. Ahora hay unos 20.000 catalogados. Fueron genotipados por amplificación por PCR de segmentos de ADN que contenían microsatélites y determinado su tamaño por geles de electroforesis. Tienen la ventaja de tener muchos alelos posibles (esto es, las personas pueden tener 5, 6, 7, etc., repeticiones), aumentando la capacidad de que la meiosis sea informativa.
- Los **polimorfismos de un solo nucleótido** son menos informativos, porque hay dos nucleótidos alternativos en el sitio polimórfico. Pero, son muy abundantes (hay unos 10 millones en la base de datos de dbSNP, ver *Referencias*) y pueden ser tipificados con técnicas que no precisan el gel de electroforesis. Esto permite utilizar varias técnicas de alto rendimiento, como los microarrays ("SNP chips") o métodos basados en clasificación de

(a)

```
ctctcacagt agccacacac acaccgctgc acagcggcct      n=5
ctctcacagt agccacacac acacaccgct gcacagcggc ct   n=6
ctctcacagt agccacacac acacacaccg ctgcacagcg gcct n=7
```

(b)

```
ttttttg tttcccttcc atgggtgata ttgcttcttg aaatacggac  A
ttttttg tttcccttcc atgggtgatc ttgcttcttg aaatacggac  C
```

(c)

```
tgcacagtga tgtggaattc gaaagctgac tgca   sitio EcoRI presente
tgcacagtga tgtggaattt gaaagctgac tgca   sitio EcoRI ausente
```

Figura 9.4 – Tipos comunes de polimorfismo de ADN. (a) Un microsatélite $(CA)_n$, (b) un A/C SNP, (c) un C/T SNP que causa un RFLP (en este caso se pierde un sitio *Eco*RI por un cambio CpG→TpG). *Eco*RI reconoce la secuencia GAATTC.

flujo de granos microscópicos. Algunos SNPs crean o eliminan sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, creando así **polimorfismos de tamaño de fragmento de restricción** (RFLP). Los RFLP eran los marcadores de ADN originales, sustituidos por los microsatélites para el mapeado general, pero siguen siendo útiles.

Todos los polimorfismos de ADN tienen una gran ventaja como marcadores genéticos: pueden ser localizados fácilmente en una región cromosómica específica. Originalmente esto se hacía por FISH (ver *Sección 4.2*) o métodos relacionados; ahora se puede hacer simplemente buscando en una base de datos del genoma para la localización de secuencias únicas adyacentes. Así el mapeo genético tiene ahora disponible un denso abanico de marcadores.

Reconocimiento de recombinantes

La *Figura 9.5* muestra un árbol genealógico donde los recombinantes y los no recombinantes pueden contarse de forma inequívoca. En esta familia se está segregando una enfermedad dominante, y los individuos han sido tipificados para el polimorfismo de ADN que tiene alelos 1, 2, 3 y 4. La recombinación entre la enfermedad y el locus del marcador puede haber ocurrido en cualquier meiosis del árbol, pero solo puede ser detectada en la descendencia del individuo doble heterocigoto II-2. Ella ha recibido el alelo marcador 2 con el gen de la enfermedad de su madre y el alelo marcador 4 con el alelo normal en el locus de la enfermedad de su padre. La descendencia que herede cualquiera de estas combinaciones son no recombinantes; aquellos que hereden la enfermedad +4, o normal +2, son recombinantes. Hay dos recombinantes en diez meiosis.

Si tenemos ADN solo de las dos últimas generaciones de la familia en la *Figura 9.5* (los abuelos estaban muertos, o no querían dar su ADN) no podríamos decir cuál de los descendientes de la última generación eran recombinantes y cuáles eran no recombinantes. Sabríamos que había uno de un tipo y ocho del otro, y

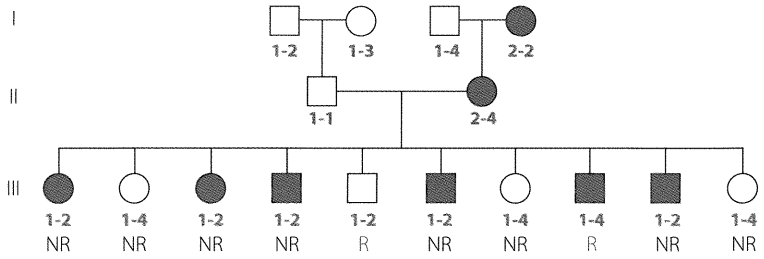


Figura 9.5 – Identificación de recombinantes y no recombinantes en un árbol genealógico humano. NR, no recombinantes. **R**, recombinantes. Para detalles ver texto completo.

podríamos adivinar que había dos que posiblemente eran recombinantes, pero no lo sabríamos con certeza. El individuo II-2 podía haber heredado el alelo marcador 4 con la enfermedad; en ese caso debería haber ocho recombinantes y solo dos no recombinantes. Si estamos recogiendo familias con una enfermedad genética poco común, no encontraremos familias con una estructura ideal como la de la *Figura 9.5*. Probablemente terminaremos utilizando familias cuya estructura no nos permita identificar a los recombinantes de manera inequívoca.

Para solucionar este problema, el mapeo humano utiliza programas informáticos que no tratan de identificar individuos recombinantes, sino que por el contrario calculan la probabilidad de los datos completos de un árbol, sobre la suposición alternativa de que los dos loci están ligados (con una fracción de recombinación específica) o no ligados. El ratio de las dos probabilidades proporciona evidencias a favor o en contra del ligamiento. Si el ratio de probabilidad apoya el ligamiento, la fracción de recombinación más probable es la que da el ratio de probabilidad más favorable. La estadística obtenida de este análisis es el logaritmo del ratio de probabilidad, conocido como el *lod score*. Por qué se utiliza esta estadística se explica en Strachan y Read (2003) con más detalle en Ott (1999).

Conseguir bastantes meiosis

Incluso en las circunstancias más favorables (un árbol genealógico ideal con no recombinantes) se necesita un mínimo de diez meiosis para proporcionar una evidencia del ligamiento significativa estadísticamente. Si queremos mapear una enfermedad, tenemos que tomar las familias tal y como nos las encontramos. La estructura raramente es ideal; las personas pueden ser homocigotas para el marcador (recuerde que solo podemos contar las meiosis doble heterocigotas) y probablemente habrá algunos recombinantes. Debido a estos factores, los análisis de ligamiento raramente tienen éxito con menos de 20 meiosis, y se deben combinar varias familias. Es entonces muy importante que estemos seguros de que realmente tienen la misma enfermedad, causada por una mutación en el mismo locus. La heterogeneidad de los locus es un obstáculo serio.

Protocolo para buscar ligamientos

Un proyecto de mapeo típico suele comenzar por la búsqueda de familias donde se segrega la enfermedad de interés. Una clasificación clínica excelente en esta etapa es crucial para llegar al éxito. Es imperativo llegar al diagnóstico correcto, estar seguro de que todas las familias realmente tienen la misma enfermedad y que las personas están correctamente clasificadas en afectas y no afectas. Cuando la enfermedad tiene una expresión variable (Ver *Cuadro de enfermedad 1*), esta puede ser una tarea exigente. Una vez que tenemos comprobadas las familias, debe convencerse a los miembros afectos y no afectos para que nos faciliten una muestra, normalmente sangre, para realizar el estudio. Por fortuna, muchos componentes de una familia con una enfermedad que se está segregando están dispuestos a ayudar en la investigación, pero no es obligatorio.

En el laboratorio se extrae el ADN y luego se genotipan las muestras para una serie de marcadores. A lo largo de los años esto se ha hecho más sencillo. Hace tiempo era una tarea dura, utilizando *Southern blots*, y llevaba años realizar-

la; ahora puede hacerse de manera automática y solo lleva unas semanas. Los marcadores son tipificados por PCR, utilizando kits comerciales disponibles con cebadores de microsatélites, o utilizando chips que permiten genotipar grandes series de SNPs en una misma operación. Para cada marcador, los genotipos deben ser alineados en el árbol y se comprueba si segregan con la enfermedad en estudio. Esto se realiza con programas informáticos que calculan los *lod scores*.

Como se ha mencionado anteriormente, el test estadístico de ligamiento es el *lod score*. Es el logaritmo de las probabilidades de ligamiento (en una fracción indicada de la recombinación) comparados con el no ligamiento. Los puntos esenciales sobre *lod score* son:

- Cada *lod score* refiere una fracción de recombinación específica; generalmente el ordenador calcula para cada marcador una tabla de *lod score* para una serie de fracciones de recombinación posibles (ver *Tabla 9.1*).
- Un *lod score* de +3 es el umbral estadístico de significancia (P=0,005).
- Los *lod score* mayores son evidencia más firme de ligamiento; el *lod score* es un logaritmo, por lo que un *lod score* de cuatro es diez veces mejor que uno de tres.
- Un *lod score* por debajo de -2 es una evidencia significativa contra el ligamiento en el umbral de la fracción de recombinación.

Se continúa haciendo el estudio de ligamiento, probando marcador tras marcador, hasta que se obtenga un *lod score* positivo que sea convincente. La *Tabla 9.1* muestra un ejemplo real.

El siguiente paso es intentar reducir al máximo la región candidata. El análisis inicial puede haber localizado el gen de la enfermedad en un intervalo de unos 10 cM entre dos marcadores adyacentes. De media a lo largo de todo el genoma, un loci separado 10 cM en el mapa genético está separado por 10Mb de ADN, aunque la relación exacta varía de localización en localización. Antes de comenzar el procedimiento de búsqueda de mutaciones en genes candidatos, conviene reducir la región candidata a menos de 1 Mb; si no, el número de posibles genes candidatos probablemente será excesivo. Para reducir la región candidata, se utilizan el Proyecto Genoma Humano o las bases de datos de dbSNPs para seleccionar una serie de nuevos marcadores (microsatélites o SNPs) que cubran la región en alta densidad. En esta etapa, a menudo es mejor revisar los resultados a mano, que dejar que lo haga el ordenador. La *Figura 9.7* muestra un ejemplo real.

Analizar los genes candidatos en busca de mutaciones

Una vez que ha sido definida una región candidata razonablemente pequeña por análisis de ligamiento, se elabora una lista con todos los genes de la región. Antiguamente, significaba años de trabajo de investigadores postdoctorales; ahora se puede "bajar" una lista de genes de la base de datos del Proyecto Genoma Humano (aunque no hay que olvidar que la lista puede estar incompleta). Se priorizan los genes a analizar siguiendo los siguientes criterios.

- **Función:** ¿La información disponible sobre la función de un gen parece un candidato probable en esta enfermedad particular? Tenga en cuenta que esta relación entre la función bioquímica y los síntomas de una enfermedad suele estar muy lejos de lo obvio. Así, el gen *FMR1* codifica un ARN-proteína de

unión; la mutación de pérdida de función causa el síndrome X frágil (OMIM 309550, *Cuadro de enfermedad 4*), cuyas características principales son retraso mental, rasgos faciales característicos y macroorquidismo.

- **Patrón de expresión:** ¿Se expresa el gen en un tejido que está afectado por la enfermedad? Los datos de expresión están disponibles en las librerías de ADNc. Una librería hecha con los tejidos suministrados solo contendrá ADNc de genes que se expresen en ese tejido.
- **Otros genes relacionados:** ¿Hay genes relacionados en otro lugar del genoma?, y si es así, ¿hay alguno de ellos que mutado de lugar a enfermedades similares?
- **Modelos animales:** ¿Hay algún animal mutante conocido para este gen?, y si es así, ¿el fenotipo es apropiado? No buscamos una correspondencia exacta, pero debe haber algún punto de semejanza.
- **Tamaño y complejidad:** En igualdad de condiciones, es más fácil analizar un gen de 2 exones que uno de 67.

Una vez establecida una lista prioritaria, en cada gen, por turnos, se buscan mutaciones en un grupo de individuos afectos no relacionados entre sí, preferiblemente aquellos en los que sabemos que la enfermedad mapea en la localización candidata. Cualesquiera de las técnicas descritas en la *Sección 5.2* (*Métodos de búsqueda de cambios de secuencia en un gen*) pueden ser utilizadas. Esta no es una tarea completamente rutinaria; no todos los exones de cada gen está correctamente representado en las bases de datos, y algunas mutaciones se encuentran dentro de los intrones o en otras zonas difíciles de estudiar. Sin embargo, con un poco de suerte, el proceso completo puede llevarle a un científico unos pocos meses. Hoy en día la parte más complicada del trabajo es la de recoger las familias y muestras necesarias.

En las enfermedades de pérdida de función, es razonable esperar encontrar diversidad de mutaciones en personas no relacionadas: sin sentido, de procesamiento y de cambio de patrón de lectura. Tal descubrimiento identificaría inequívocamente al gen como el correcto. Si solo se encuentra un cambio, pero en diferentes personas no relacionadas (lo que normalmente ocurre en enfermedades de aumento de función), será importante comprobar que no se trata de un polimorfismo común no patogénico. Esto se realiza analizando un buen número de controles sanos del mismo origen étnico. La confirmación final de que ha sido identificado el gen correcto puede venir de la construcción de un modelo animal, utilizando las técnicas de diana *knockouts* o por ARN de interferencia (Bantounas *et al.*, 2004; Iredale, 1999).

9.3 Estudio de pacientes

Discromatosis simétrica hereditaria 229 238

Se registraron varias familias japonesas en las que esta enfermedad se estaba segregando, y muchos miembros de la familia donaron sangre para la extracción de ADN (*Figura 9.6*). Las muestras de ADN de tres familias fueron tipificadas para 343 marcadores de microsatélites dispersos a lo largo de todo el genoma y se calcularon sus *lod score*. Muchos de los marcadores dieron *lod score* negativos, pero una serie de marcadores adyacentes en el cromosoma 1 dieron los de la *Tabla 9.1*.

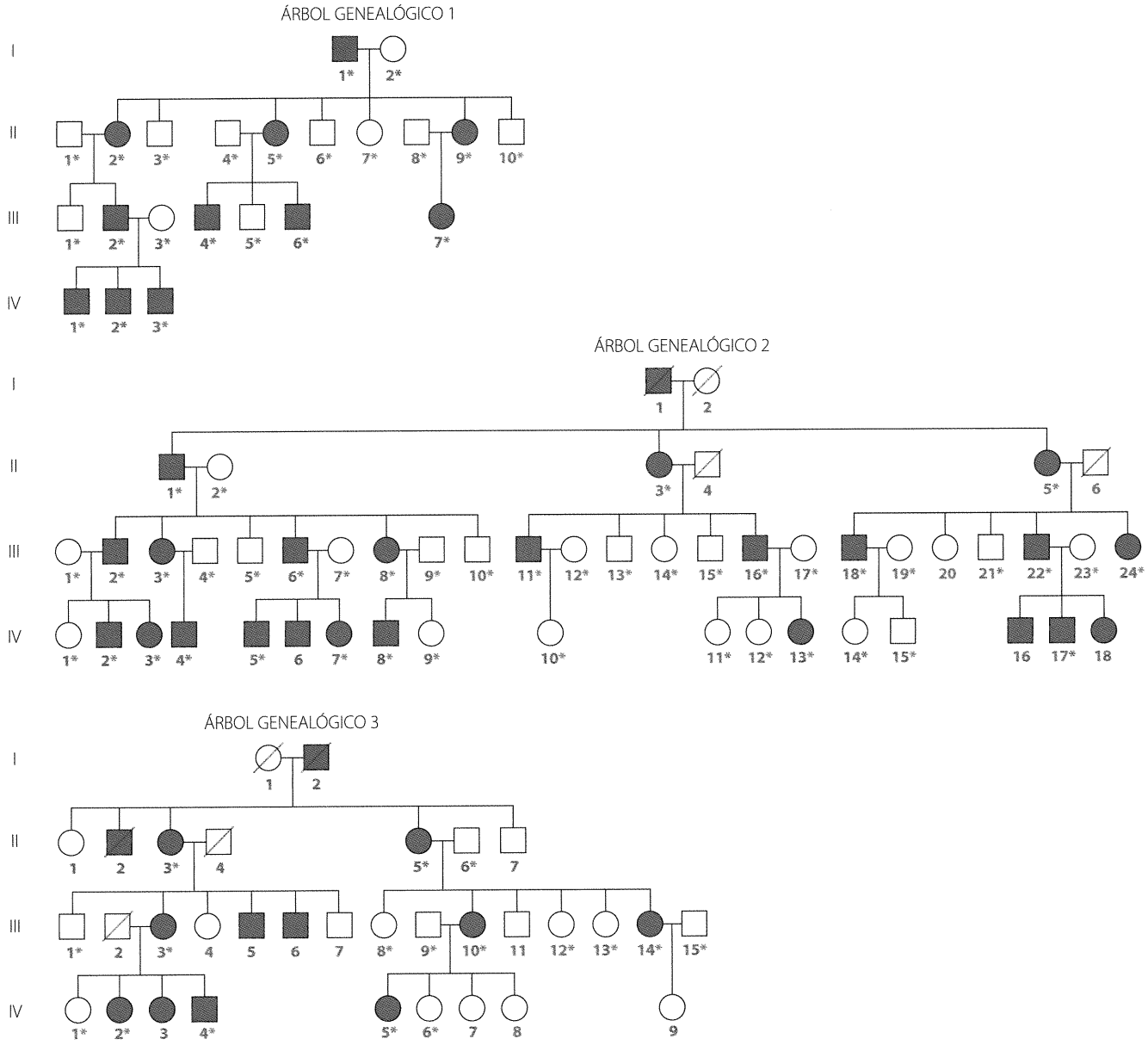


Figura 9.6 – Árboles genealógicos de tres familias utilizados por Miyamura *et al.* (2003) para mapear el gen de la discromatosis.
Los individuos marcados con asterisco aportaron muestras de ADN. Adaptada de Miyamura *et al.* (2003) con permiso de University of Chicago Press.

Puntos a tener en cuenta sobre esta tabla:

- Algunos de los *lod score* están muy por encima de 3, mostrando una evidencia sólida de ligamiento.
- El hecho de que el *lod score* a recombinación cero es menos infinito para cada marcador, significa que con cada marcador hay algunas recombinaciones entre el marcador y la enfermedad. En otras palabras, ninguno de los marcadores está extremadamente cerca del locus de la enfermedad.

Tabla 9.1 – Análisis de ligamiento en las familias de la *Figura 9.6*

Marcador	LOD EN θ =:						
	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,3	0,4
D1S424	-inf.	0,17	1,15	1,51	1,59	1,30	0,66
D1S206	-inf.	-1,21	0,56	1,29	1,59	1,51	0,90
D1S502	-inf.	3,81	4,88	5,02	4,75	3,51	1,68
D1S252	-inf.	5,46	5,96	5,78	5,29	3,77	1,79
D1S498	-inf.	4,49	4,43	4,09	3,62	2,42	1,06
D1S484	-inf.	1,80	2,99	3,34	3,31	2,62	1,42
D1S196	-inf.	-0,76	0,46	0,99	1,21	1,17	0,72
D1S218	-inf.	-7,17	-4,03	-2,40	-1,41	-0,36	0,02

La tabla muestra *lod score* calculados informáticamente para series de marcadores de microsatélites del brazo largo del cromosoma 1. θ simboliza la fracción de recombinación. Para la explicación lea el texto.

Los microsatélites marcadores están nombrados según un esquema estándar (D = segmento del ADN, 1 = en cromosoma 1; S = copia simple; el número solo se corresponde con qué marcador fue descrito primero).

Adaptada de Miyamura *et al.* (2003) con permiso de University of Chicago Press.

- Se muestran los marcadores en orden cromosómico. Los *lod score* son mayores para los marcadores del centro de la tabla que para aquellos que están al principio y al final. Esto implica que el locus de la enfermedad se encuentra en algún lugar de la parte media de la región que comprende a esos marcadores.
- No trate de dar mucho valor a un fuerte positivo *lod score*. El *lod score* de un marcador puede ser menor que el de un marcador adyacente porque uno o dos individuos pueden ser homocigotos para un marcador y no para el otro. Los individuos homocigotos no dan información al proceso de mapeo, por lo que su *lod score* es menor. No obstante, el patrón total aporta una evidencia sólida de ligamiento en los marcadores de la parte central de la región estudiada.

Los marcadores que muestra la *Tabla 9.1* se colocan a una distancia genética de 60 cM a lo largo del brazo largo del cromosoma 1. Para disminuir esta región, se genotipó a las familias con una nueva serie de microsatélites marcadores de la región candidata más cercanos entre sí. La *Figura 9.7* muestra los datos cruciales de los nuevos microsatélites *D1S489* y 11 que mapean en el espacio de 13 cM entre *D1S498* y *D1S484*. Para los 12 microsatélites marcadores de la figura se les da números arbitrarios a los diferentes alelos y se muestra el genotipo de siete individuos, cada uno como dos haplotipos. Los haplotipos se deducen de tipificar a los padres. Además de calcular los *lod score* (irrelevante ya que en esta etapa se sabe que esta es la región ligada al locus de la enfermedad), los

INDIVIDUO	1-I1		1-IV3		2-II1		2-IV4		2-IV5		3-III3		3-IV4	
D1S498	5	2	5	4	2	3	2	2	2	5	3	2	2	4
D1S2347	1	4	1	1	4	1	4	1	4	1	1	3	3	1
D1S2345	4	4	4	8	7	2	7	1	2	1	2	2	2	1
D1S2858	2	1	2	2	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2
D1S305	6	6	6	7	6	5	6	1	6	6	6	8	8	2
D1S2715	5	6	5	5	1	1	1	5	1	3	6	3	3	1
D1S2777	1	4	4	3	3	3	3	3	3	3	5	3	5	3
D1S2624	3	3	3	3	5	1	4	3	5	1	4	2	4	4
D1S506	6	6	5	4	5	5	5	4	5	5	5	2	5	5
D1S2635	7	8	8	8	7	8	8	7	7	7	7	7	7	8
D1S2771	3	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	3
D1S2707	6	2	2	6	4	6	2	6	4	6	5	6	5	2

Figura 9.7 – Haplotipos de siete individuos de los árboles genealógicos de la *Fig. 9.6.* Para explicación ver el texto. Reproducido de Miyamura *et al.* (2003) con permiso de la University of Chicago Press.

investigadores utilizan los haplotipos para establecer claramente las recombinaciones individuales.

En una familia dada, las personas más afectadas habían heredado el mismo haplotipo de marcadores con el gen de la enfermedad; es decir, en la meiosis de los padres que transmitieron el gen de la enfermedad a ese individuo, esa región de cromosoma no fue interrumpida por ningún entrecruzamiento. Las personas más afectadas de la Familia 1 tienen el haplotipo que muestra el individuo 1-I1 en verde en el cromosoma de la enfermedad. De manera similar, en la Familia 2 la mayoría tiene el haplotipo azul, y en la Familia 3 la mayoría tiene el haplotipo amarillo en el cromosoma de la enfermedad. Sin embargo, algunos individuos tienen haplotipos recombinantes, indicados en los cuadros coloreados en parte de la *Figura 9.7.* Debido a que estos individuos estaban afectados, tenían que haber heredado la enfermedad. Por lo tanto, el locus tenía que estar situado dentro del segmento coloreado de su haplotipo recombinante, o en el trozo inmediatamente adyacente. Así el individuo IV-3 de la Familia 1 nos decía que el locus de la enfermedad debía de estar cerca del marcador *D1S2777.* (Aunque el marcador *D1S2775* es el marcador mas bajo en la parte coloreada del haplotipo, el gen de la enfermedad debe estar entre este y el siguiente marcador, pero no por encima de *D1S2777.*) El individuo IV-4 de la Familia 3 nos dice que debe de estar por encima del marcador *D1S2715* (en el segmento amarillo del cromosoma). Por lo tanto, debe de estar situado entre estos dos marcadores. En los otros individuos recombinantes coincidía esta localización.

Este análisis redujo la región candidata a una localización cromosómica de 500 kb en 1q21.3. Se utilizó un programa de búsqueda para comprobar esta región en la base de datos del Proyecto Genoma Humano. Solo había siete genes en esa región. El ADN de los individuos afectos de cada familia (y de otros individuos no relacionados con la misma enfermedad) fue analizado en busca de mutaciones en cada uno de los genes. Se encontraron cambios en un gen en cada una de las muestras, el *DSRAD (double-stranded RNA-specific adenosine deaminase).* Dentro de cada familia, cada persona afectada tenía el mismo cambio, pero era

diferente entre familias, y no todos en el mismo exón (exones 2, 10, 10 y 15 en los cuatro casos no relacionados entre sí).

Parecía probarse que los cambios detectados eran las verdaderas mutaciones patogénicas. Los indicadores de esto eran los siguientes.

- Dos de las cuatro mutaciones eran mutaciones sin sentido, lo cual hace poco probable que sean variantes polimórficas comunes.
- Las otras dos mutaciones eran mutaciones de pérdida de sentido que implicaban a aminoácidos que estaban conservados en la correspondiente proteína en 11 especies animales superiores diferentes. Este grado de conservación implica que estos aminoácidos tienen funciones importantes, por lo que las mutaciones probablemente no son polimorfismos comunes.
- Para cada mutación se analizó el ADN de 116 japoneses con pigmentación normal; no se encontró ninguna de ellas. Otra vez esto hace pensar que no se trata de polimorfismos no patogénicos.

Sorprendentemente, cuando se diseñó un ratón *knock-out* del gen *DSRAD*, el resultado fue un embrión letal, incluso en heterocigosis. Aunque no fuera lo esperado, esto no refutó la identificación del gen *DSRAD* como el gen de la discromatosis. Aunque las similitudes entre hombre y ratones son mayores que las diferencias, sigue habiendo diferencias. Estas parecen ser especialmente probables cuando la afección va unida a haploinsuficiencia (donde un 50% de la actividad del gen no es suficiente para tener una función normal), como en este caso. Ninguna de las investigaciones descritas muestra porque el 50% de reducción de la actividad del gen puede causar las alteraciones en la pigmentación de la piel solo en manos y pies. Con frecuencia la identificación del gen es solo el comienzo de la investigación de por qué ocurren las cosas.

CASO 3 Familia Choudhary 3 9 66 **242** 260 376

- Niña (Nasreen) de 8 meses de edad, padres Aadnan y Multad
- Sorda
- Sus padres son primos hermanos
- El árbol genealógico sugiere sordera autosómica recesiva

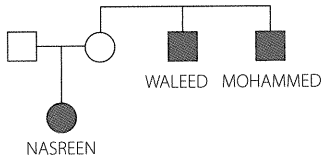
La última vez que nos encontramos con esta familia (*Capítulo 3*), era solo una hipótesis que la sordera de Nasreen fuera autosómica recesiva, o incluso que no fuera genética, ya que existen muchas causas diferentes para los problemas auditivos. El hecho de que tenía dos tíos afectos, y que todos eran descendientes de matrimonios consanguíneos, inclinaba el caso hacia autosómico recesivo, pero la única manera de probarlo era demostrar una mutación. Como se describe en el *Capítulo 3*, es muy difícil porque la hipoacusia autosómica recesiva puede estar causada al menos por 50 genes diferentes.

Aunque cualquiera de los 50 genes podía ser el responsable, en la mayoría de poblaciones, las mutaciones en el gen *GJB2*, son la causa más común. Este gen codifica la proteína conexina 26 que forma uniones *gap* entre células del oído interno. Estas uniones son importantes para el transporte de iones de potasio, que entre en las células pilosas cuando se dispara la respuesta al sonido. El *GJB2* es un gen muy sencillo, solo tiene dos exones, y toda la secuencia codificante se encuentra en el exón 2. En determinadas poblaciones son comunes las mutaciones particulares, por ejemplo, c.35delG en europeos (vea *Figura 6.2*) y c.235delC en chinos. El análisis de las mutaciones más comunes en pacientes de un grupo

étnico es muy sencillo, como sencillo es secuenciar todo este pequeño gen, por lo que este análisis se realiza con frecuencia. Aporta una respuesta definitiva a más de la mitad de los casos. Sin embargo, un resultado negativo no permite a la investigación avanzar.

Se secuenció la secuencia codificante completa del *GJB2* del ADN de Nasreen, pero no se encontró mutación en ninguna de las copias. Normalmente significa el final de la historia, pero en este caso el genetista trato de buscar más. En parte porque la familia estaba especialmente interesada en saber la causa de la sordera de Nasreen, en parte porque querían se capaces de reducir el riesgo de recurrencia de los tíos de Nasreen, Waleed y Benazir (árbol en *Figura 1.9*) que estaban, como se explicó en el *Capítulo 1*, planeando casarse y en parte porque la estructura de la familia permitía mayores investigaciones.

Si asumimos que Nasreen, Waleed y su hermano Mohammed tenían la misma sordera autosómica recesiva, parecía probable que uno u otro de los tatarabuelos de Nasreen había sido portador heterocigoto de la mutación, y que los tres individuos sordos habían heredado cada uno las dos copias del gen mutante original como resultado de los matrimonios consanguíneos en la familia. Si, de hecho, todos tenían las dos copias del segmento cromosómico ancestral, todos debían ser homocigotos para el mismo grupo de marcadores alélicos en la región cromosómica que rodeaba al gen mutante. Por lo tanto, se decidió en los tres pacientes tipificar microsatélites marcadores polimórficos de las zonas lo más cercanas posible al loci de la sordera. La página web "The Hereditary Hearing Loss Homepage" (ver *Sección 9.5*) proporciona una lista de microsatélites que se encuentran ligados a loci de sordera. Utilizando esta base de datos del Proyecto Genoma Humano, el genetista diseñó una lista de marcadores y pidió al laboratorio que genotipara cada una de las tres muestras con cada marcador. Este procedimiento, usado en familias endogámicas, es conocido como mapeo de autocigocidad. "Autocigocidad" significa 'homocigocidad de descendientes por un antecesor común definido'.



GENOTIPOS PARA:			
D10S537	2-4	4-4	4-1
D10S1432	2-1	2-1	4-2
D2S174	6-6	6-6	6-6
D2S158	2-2	2-2	2-2

Figura 9.8 – Mapeado de autocigosidad.
Los tres individuos sordos en la familia Coudhary fueron tipificados para una serie de marcadores ligados a diferentes loci de sordera. Se muestra el resultado de los marcadores *D10S537* y *D10S1432*, que excluyen el locus *DFNB12* en el cromosoma 10q22, y para los marcadores *D2S174* y *D2S158* que dan resultados consistentes con el ligamiento al locus *DFNB9* en 2p22-p23.

Los marcadores *D2S174* y *D2S158*, que están fuertemente ligados al locus de la sordera *DFNB9*, mostraban un patrón consistente con el ligamiento (*Figura 9.8*). Este resultado se confirmó tipificando con una serie de marcadores muy ligados en el cromosoma 2q22. Estos mostraban que Nasreen, Waleed y Mohammed eran homocigotos para una haplotipo de muchos marcadores que rodeaban al locus *DFNB9*. El gen de importancia era el *OTOF* (Otoferlina), con 48 exones. Sin el alto índice de sospecha proporcionado por el análisis de ligamiento, no valdría la pena analizar un gen tan grande en busca de mutaciones. En este caso estaba justificado, y la búsqueda reveló que los tres individuos sordos eran homocigotos para un cambio A > G en la unión intrón 8–exón 9 del gen *OTOF*. Esta mutación altera el sitio de *splicing* invariable AG y, posiblemente, hacía que el gen no fuera funcional. Es curioso, que aunque hay una gran heterogeneidad alélica en las mutaciones del *OTOF*, como es habitual en las enfermedades de pérdida de función, la misma mutación había sido descrita previamente, esta vez en una familia de la India. Sería posible descubrir que ambas familias poseían la mutación heredada de un antecesor común desconocido, si se pudiera obtener ADN de un miembro afecto de la familia india. Si el caso de la India tuviera el mismo segmento cromosómico ancestral, podrían tener el mismo haplotipo de SNPs que rodean a la mutación.

9.4. Resumen y ampliación

Utilización de las anomalías cromosómicas para sugerir una región o un gen candidato

El análisis de ligamiento requiere un mínimo de 10 meiosis informativas para permitir que el *lod score* llegue a 3 (el umbral de significancia). En realidad, se necesitan unas 20 meiosis para tener una oportunidad de éxito. Una meiosis informativa para ligamiento es aquella que puede resolver si es o no recombinante para una enfermedad o marcador. El requerimiento básico es un progenitor que sea heterocigoto para la enfermedad y el marcador, por lo que podemos averiguar en él qué alelo en cada locus ha recibido de cada uno de sus progenitores y qué alelo ha pasado a su hijo.

Algunas ocasiones en las que un individuo tiene una enfermedad y una anomalía cromosómica, pueden permitir al investigador evitar el análisis de ligamiento e ir directamente a analizar genes en una región candidata. Esto es especialmente importante para las enfermedades dominantes donde las personas afectas raramente se reproducen. Como se mencionó en el *Capítulo 2*, en ocasiones el punto de rotura de una traslocación cromosómica o una inversión interrumpen el gen. Si la pérdida de una copia del gen causa la enfermedad, la persona tendrá la enfermedad. Así, los clínicos tienen que estar atentos a las personas que tienen tanto una enfermedad mendeliana como una anomalía cromosómica, especialmente si ambos ocurren *de novo* en un individuo. Algunas veces puede ser solo una coincidencia, pero en algunos casos dan la pista crucial para identificar el gen de la enfermedad. El síndrome de Rubinstein-Taybi (ver *Cuadro de enfermedad 9*) es un buen ejemplo. En la *Tabla 9.2* se dan otros ejemplos.

Tabla 9.2 – Casos que sirvieron de alerta a los clínicos para proporcionar una pista crucial para identificar el gen de una enfermedad

Enfermedad	Localización cromosómica	Observación clínica crucial
Distrofia muscular de Duchenne	Xp21.3	(a) Un niño con DMD y una deleción visible en Xp21.3 (b) Una mujer con DMD y una traslocación recíproca equilibrada de X;21. Ambos casos apuntaban a Xp21.3 y proporcionaron una ayuda a los investigadores sobre la región de la enfermedad en el ADN en los primeros años del clonaje posicional.
Síndrome Waardenburg tipo I	2q35	Un niño con una enfermedad de novo y una inversión de novo en 2q35-q37.3. El análisis directo de ligamiento en esas localizaciones en los años en los que cada marcador requería una semana o más de trabajo.
Síndrome Williams-Beuren	7q11.23	Una familia donde la estenosis aórtica supravalvular cosegregaba con una traslocación recíproca equilibrada, t(6;7)(p21.1;q11.23). Ver *Cuadro de enfermedad 3.*
Síndrome de Sotos	5q35	Un paciente con la enfermedad y una traslocación recíproca t(5;8)(q35;q24.1). El punto de rotura interrumpía el gen *NSD1*, que se vio que estaba mutado o delecionado en los casos de este síndrome.

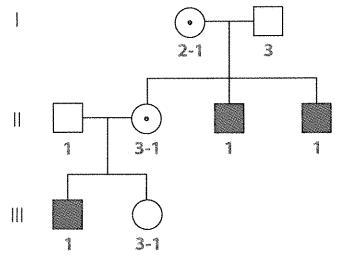


Figura 9.9 – Utilización del seguimiento de un gen para predecir el riesgo genético. Lea el texto para explicación. NB, los hombres solo tienen un alelo de cualquiera de los marcadores del cromosoma X.

Seguimiento de un gen: marcadores de ligamiento para predecir los riesgos en un árbol genealógico

En las familias con discromatosis, los investigadores saben qué individuos están afectos y no afectos, y analizan muchos marcadores para encontrar cuáles cosegregan con la enfermedad. Sin embargo, una vez que el investigador ha identificado un marcador que realmente lo hace, es posible que se utilice este marcador para predecir quién en la familia ha heredado o no el gen de la enfermedad. Esto se conoce como **seguimiento de un gen**. La *Figura 9.9* muestra un ejemplo hipotético. El árbol genealógico muestra una enfermedad recesiva ligada al X y los genotipos de marcadores polimórficos que se saben que están ligados al locus de la enfermedad. Evidentemente, el cromosoma es portador del alelo 1 del marcador. El individuo III-2 ha heredado el alelo 3 de su madre portadora y tiene, por tanto, un riesgo muy bajo de ser portador. Su riego no es cero, porque es posible que haya habido recombinación entre el locus de la enfermedad y el marcador durante la meiosis que ha producido un óvulo del que ella se ha desarrollado. Tenga en cuenta que no se puede deducir el riesgo simplemente mirando los genotipos de marcadores individuales (por ejemplo, III-2 tiene el mismo genotipo marcador que su madre portadora, pero en su caso esto significa que ella no es portadora). Tiene que seguir la segregación de un cromosoma a lo largo del árbol.

En los días en los que se mapearon los loci de las principales enfermedades, conociendo los marcadores ligados, y el gen de la enfermedad no había sido identificado, el seguimiento del gen era una parte importante de la genética clínica. Una vez que se conoce el gen de la enfermedad es preferible buscar directamente

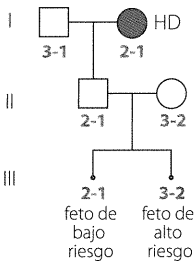


Figura 9.10 – Test de exclusión fetal para la enfermedad de Huntington. Los números son alelos de marcadores próximos al locus HD. Ver texto para explicación.

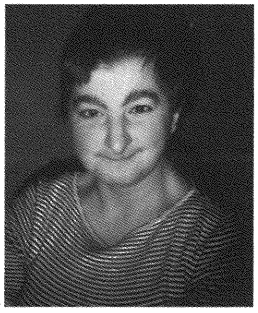
sus mutaciones. Algunas veces el seguimiento de genes se sigue utilizando en genes grandes con muchos exones, donde la búsqueda de mutaciones en el gen completo resulta muy caro. Una aplicación especial es el test de exclusión fetal. En la *Figura 9.10*, II-1 tiene un riesgo del 50% de heredar la enfermedad de Huntington porque su madre está afecta. Él optó por no hacerse un test predictivo, pero de acuerdo con su esposa no quería que sus hijos sufrieran la misma ansiedad de por vida. Un análisis directo prenatal para la mutación de la enfermedad de Huntington (expansión de repeticiones $(CAG)_n$, ver *Figura 4.18*) les diría si su feto era o no portador; pero si era positivo, II-1 sabría que era portador de la mutación de la enfermedad de Huntington, y no deseaba saberlo. En su lugar, se utilizó un marcador de ligamiento. El feto III-1 había heredado el cromosoma que II-1 había recibido de su padre no afecto. Por lo tanto, estaba libre de riesgo (barriendo la recombinación en la meiosis paterna). El feto III-2 había heredado el cromosoma que venía de la abuela afecta. Tenía un 50% de riesgo de haber heredado la mutación de la enfermedad de Huntington. Los padres decidieron que llevarían a término los dos embarazos. De esa manera, estaban seguros de tener solo niños sanos, sin saber si II-1 era o no portador de la mutación. La desventaja es que cualquier feto abortado tenía un 50% de probabilidad de haber sido normal.

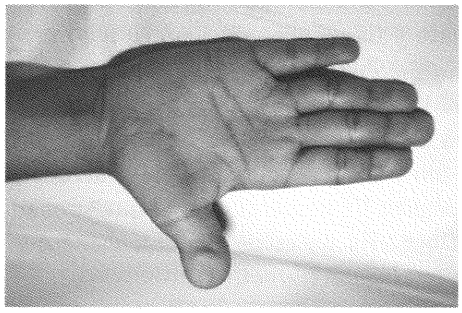
Tenga en cuenta que en el seguimiento de un gen, el genotipo marcador de un individuo no nos dice sobre el gen en cuestión. Lo que importa es el patrón de segregación de la enfermedad y el marcador en la familia. En la *Figura 9.10*, el genotipo marcador 2-1 que está presente en el abuelo afecto,indica bajo riesgo cuando se encuentra en el feto, mientras que el hecho de que II-1 también tipo 2-1 no nos dice nada sobre su enfermedad. El marcador no es el gen de la enfermedad; no es una variante patogénica, solo se encuentra en la misma región del cromosoma que el gen de la enfermedad.

Cuadro de enfermedad 9

Síndrome Rubinstein–Taybi (OMIM 180849)

El síndrome Rubinstein-Taybi (RSTS) tiene un diagnóstico clínico bien definido. Los pacientes tienen retraso mental, aspecto facial característico, pulgares anchos y dedos de los pies grandes. La mayor parte de los casos son esporádicos; los hermanos de los pacientes de RSTS casi nunca están afectos (riesgo de recurrencia 0,1%). Sin embargo, se conocen unos


(a)


(b)


(c)

Características clínicas del síndrome Rubinstein–Taybi.
(a) Características faciales tísicas, (b) pulgares anchos, (c) aspecto hípico de los dedos de los pies grandes.

pocos casos de gemelos monocigóticos con el síndrome y en la mayoría de los casos ambos gemelos eran afectos (esto es, eran concordantes). Se conocen pocos casos de individuos con RSTS con hijos y el riesgo de recurrencia es alto, podría ser del 50%. La interpretación más probable es que el RSTS es una enfermedad autosómica dominante; y porque afecta a personas que casi nunca se reproducen, casi todos los casos son por nuevas mutaciones. Debido a la falta de árboles genealógicos adecuados, era muy difícil hacer un mapeo para el gen o genes del RSTS por análisis de ligamiento. La identificación de dos pacientes de RSTS con una traslocación cromosómica recíproca aportó pistas cruciales. Uno de los pacientes tenía una traslocación 2;16, t(2;16)(p13.3;p13.3) y el otro una traslocación 7;16, t(7;16)(q34;p13.3). Encontrar a ambos individuos fue una casualidad, pero estaban seguros de que era significativo que ambos tuvieran un punto de rotura en 16p13.3. Un grupo de investigadores alemanes reunió un grupo de pacientes y utilizó una serie de sondas clonadas para 16p13.3 para realizar hibridación *in situ* fluorescente (FISH, ver *Sección 4.2*). Seis de los 24 pacientes analizados tenían una microdeleción. El punto de rotura de la microdeleción siempre estaba en una región de 150 kb, donde los investigadores clonaron el gen *CREBBP*. Cuando se estudió en pacientes de RSTS sin deleción, se encontraron con dos mutaciones sin sentido. Así, el gen del RSTS fue identificado sin utilizar el análisis de ligamiento.

La proteína producto del gen *CREBBP*, es la proteína de unión a CREB, una proteína nuclear de gran tamaño con actividad histona acetiltransferasa, que está implicada en reordenamiento de la cromatina y en la activación transcripcional de un gran número de genes. Este gen evoca al producto del gen *ATRX* (*Cuadro de enfermedad 2*). Al igual que ATRX, RSTS es una enfermedad de la cromatina. Sin conocer en detalle los genes diana, no es posible relacionar el fenotipo clínico con el defecto en el gen. Los cambios causativos en *CREBBP* han sido identificados solo en el 40% de los casos de RSTS (36/92 en un estudio reciente); 3/92 tenían mutaciones en el gen *EP300* que codifica una histona acetiltransferasa relativamente cercana. Este es un ejemplo de cómo la forma en la que se investigue un síndrome clínico puede contribuir al entendimiento de una ruta bioquímica (vea *Sección 6.4*). Queda por comprobar si hay más cambios poco evidentes que afectan a la función de la proteína de unión CREB, o si lo que afecta son las mutaciones de otros muchos genes cuyos productos interaccionan con la proteína de unión CREB.

El RSTS no es realmente un síndrome de microdeleción. Los verdaderos síndromes de microdeleción, como el síndrome de Williams-Beuren (*Cuadro de enfermedad 3*), siempre están causados por microdeleciones porque su fenotipo depende de una haploinsuficiencia de varios genes contiguos. El RSTS está causado por una haploinsuficiencia en un único gen, *CREBBP*. Un mecanismo para producir esto es una microdeleción, pero cualquier cambio que produzca pérdida de función produce el fenotipo. Una situación similar ocurre en el síndrome de Alagille (OMIM 118450): el 7% de los pacientes de Alagille tienen deleciones en 20p12 que incluye al gen *JAG1*; el resto tiene otras mutaciones en el gen *JAG1*. Las microdeleciones y otros reordenamientos cromosómicos han proporcionado rutas inestimables para identificar los genes de enfermedades, pero no son partes esenciales de la patogénesis.

Las enfermedades dominantes que son incompatibles con la reproducción aportan desafíos para la identificación de genes. El análisis por ligamiento no es posible; si las anomalías cromosómicas apuntan a una localización candidata, la mejor alternativa es intentar adivinar el gen candidato, basándose en analogías con las mutaciones que causan la enfermedad en los genes relacionados de humanos y animales.

9.5. Referencias

Bantounas I, Phylactou LA y Uney JB (2004) RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *J. Mol. Endocrin.* 33: 545–557. *Texto entero en* http://jme.endocrinology-journals.org/cgi/content/full/33/3/545

dbSNP public database: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/

Hereditary Hearing Loss Homepage http://webhost.ua.ac.be/hhh

Iredale JP (1999) Demystified... gene knockouts. *Mol. Pathol.* 52: 111–116. *Free full text at* http://mp.bmjjournals.com/cgi/reprint/52/3/111

Miyamura Y., Suzuki T., Kono M., *et al.* (2003) Mutations of the RNA-specific adenosine deaminase (DSRAD) gene are involved in dyschromatosis symmetrica hereditaria. *Am. J. Hum. Genet.* 73: 693–699.

Griffiths AJF, Gelbart WH, Lewontin RC y Miller JH (1999) *Modern Genetic Analysis.* WH Freeman, New York.

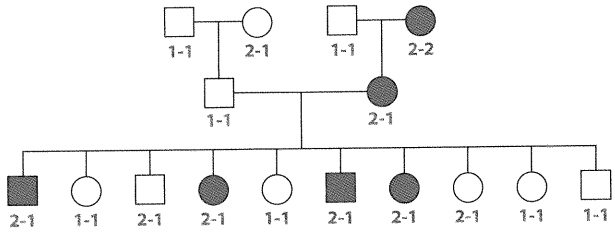
Conceptos generales

Ott J (1999) *Analysis of Human Genetic Linkage* 3rd edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore. *Una gran exposición sobre las bases del mapeo génico.*

Strachan T y Read AP (1999) *Genética molecular humana,* Ediciones Omega, S.A., Barcelona. *Este libro habla de manera extensa de lo visto en el tema 9. Puede ver el Capítulo 11 de la 2ª edición en NCBI Bookshelf, o el Capítulo 13 de la 3ª edición.*

9.6. Ejercicios de autoevaluación

(1) El árbol genealógico muestra una familia con una enfermedad autosómica dominante con penetrancia completa. Los genotipos mostrados son para los polimorfismos de ADN de los alelos 1 y 2.



(a) Marque cada meiosis como claramente no recombinante, recombinante, probablemente no recombinante, probablemente recombinante o no informativa.

(b) ¿Cuál es la mejor estimación de la tasa de recombinación?

(c) Analice la significancia de la desviación desde la hipótesis nula del 50% de recombinación (sin ligamiento) utilizando χ^2. ¿El resultado es significativo?

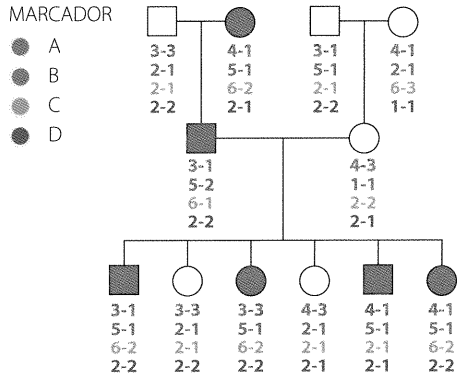
(d) ¿En qué proporción de estos árboles esperas observar un patrón de marcadores en la generación III si no hay ligamiento entre el marcador y la enfermedad? Llámelo L1.

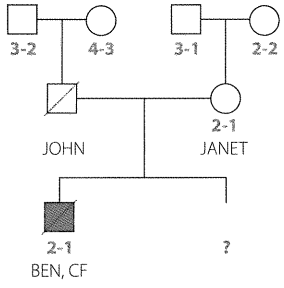
(e) ¿En qué proporción de estos árboles espera observar un patrón de marcadores en la generación II si hay ligamiento (fracción de racombinación θ) entre el marcador y la enfermedad? Llámelo L2 (por supuesto, L2 es una fracción de θ).

(f) Tabule los valores de L1, L2, L1/L2 y $\log_{10}$(L1/L2) para θ =0,05, 0,1, 0,2....0,5.

(g) $\log_{10}$(L1/L2) es el *lod score*. ¿Cuál es el *lod score* máximo? ¿Es significativo? Coméntelo.

(2) En la siguiente familia, se está segregando una enfermedad autosómica con penetrancia completa. La enfermedad ha sido mapeada en estudios previos en 2q35. El árbol muestra el genotipo para cuatro polimorfismos de ADN dentro de la región candidata, colocados en orden cromosómico. ¿Pueden reducir la zona del locus de la enfermedad con estos datos?





(3) Janet está esperando su segundo hijo en el momento en que su marido John y su hijo de 14 años Ben fallecen en un accidente de coche. Ben tenía fibrosis quística. Janet quiere desesperadamente tener el bebé, pero se ve incapaz de soportar una segunda tragedia de tener otro hijo con fibrosis quística. Solo después del doble entierro se dio cuenta de este problema y se lo comunicó a su médico. Este le sugirió que se realizara un análisis prenatal, pero necesitaba muestras de ADN de Ben y de su padre y ambos habían sido incinerados. Se contactó con los parientes mayores de John y estos dieron una muestra de mucosa oral para hacer los análisis de mutaciones. Una semana más tarde el laboratorio pidió muestras de sangre para poder hacer análisis de secuenciación más extensos, porque el test multiplex OLA no había revelado ninguna mutación en las muestras de los parientes. Sin embargo, no fue posible ponerse en contacto con ellos, ya que se habían embarcado en un crucero para olvidar lo sucedido. Se buscó una gota de sangre que tenían en los archivos de las pruebas rutinarias que le habían realizado a Ben cuando

había nacido. La muestra estaba demasiado degradada para ser utilizada en la búsqueda de mutaciones, pero el laboratorio fue capaz de tipar un polimorfismo que estaba ligado al locus de la fibrosis quística. Todas las muestras disponibles fueron tipadas para este marcador, con los resultados que se muestran. ¿Cuáles son los genotipos e implicaciones para el feto si se realiza un análisis?

(4) Un estudio de ligamiento ha mapeado un gen candidato que causa una enfermedad mendeliana en una región de 2Mb. La búsqueda en una base de datos muestra que esta región contiene los siguientes genes:

- Una enzima implicada en reacciones de detoxificación en el hígado
- Un transportador de fosfato
- Un componente de la subunidad mayor del ribosoma
- Un componente codificador nuclear de la cadena mitocondrial de transporte de electrones
- Una proteína de expresión ubicua de función desconocida que contiene una serie de glutaminas de tamaño variable
- Una enzima catalizadora de un paso del ciclo de los ácidos tricarboxílicos
- Una proteína de función desconocida expresada en el sistema nervioso central adulto y en retina
- Un factor de transcripción expresado solo en regiones restringidas del embrión temprano.
- Un factor de transcripción de expresión ubicua
- Un componente de la vía de reparación del ADN

¿Cuál sería su primer gen candidato para la búsqueda de mutaciones si la enfermedad en cuestión fuera...

(a) una enfermedad neurodegenerativa de inicio adulto que muestra anticipación?
(b) una malformación esquelética tipo raquitismo?
(c) ausencia de glándula pituitaria?
(d) un síndrome de aceleración del envejecimiento?
(e) una combinación de sordera y diabetes?

Capítulo **10**

¿Por qué unas enfermedades son frecuentes y otras son raras?

Conceptos y habilidades que aprenderá en este capítulo

Después de estudiar este capítulo será capaz de:

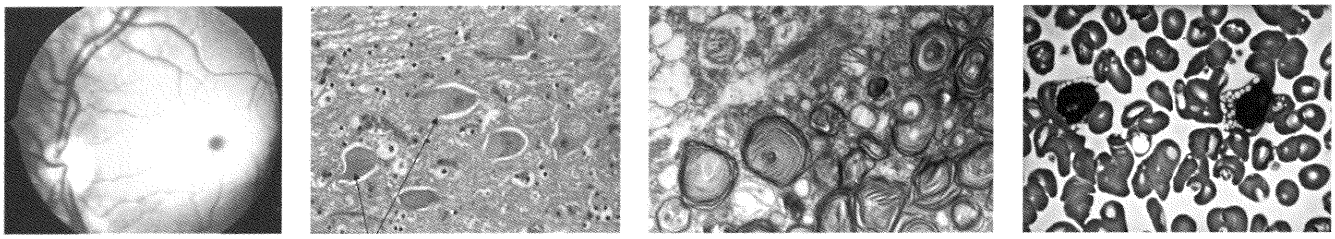
- Definir frecuencia génica, endogamia, efecto fundador, coeficiente de parentesco.
- Utilizar la fórmula de Hardy-Weinberg para calcular la frecuencia de portadores en enfermedades recesivas autosómicas y ligadas al X.
- Describir cualitativamente los efectos de la endogamia y utilizar el método del coeficiente de Sewall Wright para calcular los genes que comparten con sus parientes.
- Describir las consecuencias de la ventaja de la heterocigosis y dar ejemplos.
- Explicar por qué es difícil cambiar las frecuencias génicas en una población mediante intervenciones médicas.

10.1. Historias clínicas

CASO 21 | Familia Ulmer | **251** | 259 | 281 | 376

- Hannah, bebé de 6 meses
- Origen judío ashkenazi
- Enfermedad de Tay-Sachs

Las familias de Rachel y Uzi Ulmer provienen del este de Europa y son judíos ashkenazi, aunque nadie de la familia es religioso, y Rachel y Uzi no asistieron a escuelas judías ni a la sinagoga. Hannah es su tercera hija; tenían dos niños sanos de 5 y 3 años, cuando Hannah nació. Hannah parecía estar muy bien y sonreía y levantaba la cabeza de manera normal. Sin embargo, en la revisión de los seis meses, el doctor notó que su control de la cabeza no era bueno y la citó nuevamente para cuatro semanas más tarde. Estaba preocupado porque su sostén cefálico había empeorado y parecía menos sensible. Le realizó un examen neurológico completo y encontró que la niña tenía puntos rojo cereza en la mácula de ambos ojos. El médico estaba seguro que Hannah padecía la enfermedad de Tay–Sachs (OMIM 272800) y tomó muestras de sangre para medir sus niveles de hexosaminidasa A. Los niveles fueron extremadamente bajos, lo que confirmó el diagnóstico. Rachel, Uzi y sus familias estaban desolados ante el grave pronóstico que le habían dado a Hannah, pero decidieron tratar de hacer su vida lo más confortable posible. Durante los tres años siguientes Hannah se fue deteriorando cada vez más; sus miembros se volvieron espásticos y perdió la visión y la audición. Murió a la edad de cuatro años y medio.



(a) (b) (c) (d)

Figura 10.1 – (a) Un punto rojo cereza característico en la retina de un niño con la enfermedad de Tay–Sachs. (b) Neuronas con forma de globo en el sistema nervioso central (flechas). (c) Cuerpos celulares anormales observados con microscopio electrónico. (d) Linfocitos vacuolados. Son característicos de las enfermedades de depósito lisosomales. Fotos cortesía de los doctores Ed Wraith y Guy Besley, Royal Manchester Children's Hospital.

10.2. **Antecedentes**

Este capítulo trata sobre **frecuencias génicas**: lo que determinan, cómo pueden cambiar y la forma en que se pueden utilizar para calcular los riesgos genéticos en multitud de situaciones. Observa que el término "frecuencia génica" resulta inapropiado; realmente queremos decir *frecuencia alélica*. Las frecuencias génicas son números que se encuentran entre 0 y 1; tradicionalmente simbolizadas como p y/o q.

Las frecuencias génicas dependen del concepto de **pool génico**. Este consistiría en el conjunto de todos los alelos de un locus particular en una población definida. La población podría ser desde una muy pequeña hasta toda la humanidad. Dentro del pool génico, la frecuencia génica del alelo A es la proporción de todos los alelos que son A. Esto es también la probabilidad de que un gen, elegido al azar del pool, sea A. La mayoría de las discusiones de las frecuencias génicas en relación con la enfermedad clasifican todos los alelos de un locus sólo en dos categorías, alelos normales y alelos de enfermedad. Si secuencias el ADN, probablemente encontraría que cada uno incluye un amplio rango de variantes, y para algunos propósitos podría considerar cada secuencia variante como un alelo distinto. Cualquiera que sea el esquema que utilice para clasificar los alelos, las frecuencias de todos los alelos de una población deben sumar 1.

Los clínicos suelen estar más interesados en la frecuencia de los genotipos que en la de los genes. Quieren saber la probabilidad de que una persona seleccionada al azar sea homocigota o heterocigota para un alelo anormal. La distribución de Hardy–Weinberg (*Cuadro 10.1*) describe la relación entre las frecuencias genotípicas y las frecuencias génicas. La distribución de Hardy–Weinberg hace posible calcular la frecuencia de portadores de enfermedades recesivas en una población. Las reglas mendelianas básicas son la herramienta central para calcular los riesgos genéticos.

El modelo de la "bolsa de judías" que utilizamos en el *Cuadro 10.1* para obtener la fórmula de Hardy–Weinberg ilustra una importante condición previa de la distribución. La probabilidad de que la segunda judía sea A o a debe ser totalmente independiente de si la primera fue A o a. En términos genéticos, la

Cuadro 10.1

La distribución de Hardy–Weinberg

Suponga que hay dos alelos en una población, A y a (si puede haber o no otros, no importa). La frecuencia génica de A es p y la de a es q. p y q sumarán 1 si A y a son los únicos alelos en la población; si hay otros alelos $p+q$ será menos de 1. La distribución de Hardy–Weinberg predice que las frecuencias de los tres posibles genotipos son:

AA	Aa	aa
p^2	$2pq$	q^2

Los libros en ocasiones exponen esto como $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, lo cual es incorrecto. La distribución de Hardy–Weinberg no es una ecuación. Describe la relación entre las frecuencias génicas y las frecuencias genotípicas. p^2, $2pq$ y q^2 solo suman 1 si esos dos alelos son los únicos alelos en la población, así que todos los individuos serán AA o Aa o aa. Si hay tres alelos en la población (A, a y a_1, con frecuencias p, q y r) las frecuencias de AA, Aa y aa son todavía p^2, $2pq$ y q^2, pero existen también otros genotipos en la población. La distribución total es:

AA	Aa	aa	Aa_1	aa_1	a_1a_1
p^2	$2pq$	q^2	$2pr$	$2qr$	r^2

La base de la distribución de Hardy–Weinberg se puede ver fácilmente haciendo un pequeño experimento mental. Imagine todos los genes de un pool de genes como una gran colección de judías en una bolsa. Una proporción p de judías son del tipo A y una proporción q son del tipo a. Con los ojos cerrados, meta la mano en la bolsa y coja una judía. La probabilidad de A es p y la de a es q. Coja una segunda judía. Otra vez la probabilidad de A es p y la a es q (asumimos que hay suficientes judías en la bolsa de manera que la falta de la primera judía no cambia significativamente p o q). La probabilidad de que ambas judías sean A es p^2, la de que ambas sean a es q^2. La probabilidad de que la primera judía sea A y la segunda a es pq; igualmente la probabilidad de que coja primero una judía a y después A es pq. En conjunto, la probabilidad de que coja una judía A y otra a es $2pq$.

distribución genotípica será Hardy–Weinberg solo si el **apareamiento se realiza al azar.** Apareamiento al azar no quiere decir amor libre, sino que no preguntas por el genotipo de tu pareja como primera premisa. Esto no es tan rebuscado como suena. Existen muchas formas en las que las personas tienden a seleccionar compañeros basándose en parte en el genotipo. Hay emparejamientos por edad, inteligencia, sordera y otros muchos fenotipos que son al menos parcialmente genéticos. El efecto de estos emparejamientos es el aumento de la proporción de homocigotos de cada alelo en la población, y el descenso de la proporción de heterocigotos, comparado con las predicciones de Hardy–Weinberg.

Los emparejamientos por afinidad son importantes principalmente en la genética clínica en el contexto de la endogamia. Los parientes comparten genes y si contraes matrimonio con un pariente, incrementas la probabilidad de que tu pareja comparta alelos comunes contigo mucho más que si lo haces con una persona no relacionada. Si eres portador de un alelo de una enfermedad recesiva existe un incremento en la probabilidad de que tu compañero sea también portador y así aumenta el riesgo de tener un hijo con la enfermedad, comparado con un pareja no emparentada. Esto se discute ampliamente en la *Sección 10.3* en relación con la familia Choudhary (Caso 3).

Hardy-Weinberg para calcular el riesgo de los portadores

Suponga que la hermana de un niño con fibrosis quística va a casarse. Ella sabe que la enfermedad es genética y quiere conocer el riesgo de tener un hijo afecto. Ella está sana pero es bastante probable que sea portadora de fibrosis quística. Esto no afecta a su salud, pero sus hijos pueden tener riesgo si su pareja también es portador. Calcular el riesgo de que su pareja sea portador es lo mismo que calcular la probabilidad de que una persona, tomada al azar de la población sea portador. Hardy–Weinberg nos permite hacer este cálculo.

Si ignoramos la extensa heterogeneidad alélica de las mutaciones de la fibrosis quística y clasificamos todos los alelos como A (funcional) y a (no funcional), con frecuencias p y q, las proporciones de los genotipos son:

AA	Aa	aa
p^2	$2pq$	q^2

La fibrosis quística afecta a uno de cada 2000 nacidos americanos de origen noreuropeo (es menos frecuente entre los hispanos, afroamericanos y americanos asiáticos). Por lo tanto, q^2 es 1/2000. De manera que q es la raíz cuadrada de 1/2000, la cual es cercana a 1/45. Un alelo de 45 en el locus *CFTR* es a; el sobrante 44/45 debe ser A (hemos decidido clasificar *todos* los alelos como A o a, así en este caso $p+q=1$). Ahora podemos calcular la frecuencia de portadores: $2pq = 2 \times 44/45 \times 1/45 = 1/23$, aproximadamente. Asumiendo el emparejamiento al azar, existe 1 probabilidad de 23 de que la pareja de la mujer sea portador.

Para las enfermedades ligadas al X el cálculo es incluso más simple. Si la hemofilia A (ver Caso 12, famila Lawton en *Capítulo 4*) afecta a un niño de cada 5000 en ciertas poblaciones, ¿cuál es la proporción de mujeres portadoras? Los varones solo pueden ser A o a, así la frecuencia de alelos de la enfermedad es simplemente igual a la proporción de varones afectos:

Mujeres			Hombres	
AA	Aa	aa	A	a
p^2	$2pq$	q^2	p	q

La frecuencia de portadores en mujeres es $2 \times {}^{4999}/_{5000} \times {}^{1}/_{5000}$ o 1 en 2500.

Para una enfermedad infrecuente, la frecuencia del alelo normal se puede aproximar a 1. Pero es importante observar que para enfermedades autosómicas recesivas infrecuentes, una proporción significativa de casos se deben a la descendencia de matrimonios consanguíneos. Este no es un factor principal en la fibrosis quística, porque esta enfermedad es relativamente común. Pero cuanto más rara es una enfermedad, mayor es la proporción de casos donde la consanguinidad es un factor. Ignorar esto y asumir solamente una distribución de Hardy–Weinberg nos puede llevar a una grave sobreestimación de la frecuencia de portadores para las enfermedades muy raras (ver debajo).

Cambio de frecuencias génicas

Las frecuencias génicas pueden cambiar de una generación a otra por un gran número de razones:

- Las nuevas mutaciones incrementan el número de alelos alterados en el pool de genes. También puede haber reversiones de mutaciones, produciendo el cambio de alelos alterados a alelos normales. Pero para mutaciones de pérdida de función, el proceso es en gran parte unidireccional. Cualesquiera de las múltiples posibilidades de cambios de secuencia pueden transformar un gen funcional en uno no funcional, pero solo una mutación reversa específica puede restaurar la función de un alelo no funcional. La tasa de mutación hacia delante–mutación reversa puede ser del orden de 1000:1. Otras mutaciones pueden producirse también en alelos no funcionales, pero el alelo permanecerá no funcional.
- La selección natural puede retirar alelos alterados del pool de genes si la enfermedad hace que los afectados sean menos capaces de reproducirse. La selección artificial podría tener un efecto similar (ver *Sección 10.4*).
- La gran afluencia de emigrantes de una población con frecuencias génica sustancialmente diferentes podría cambiar el pool de genes.
- Si la población reproductiva es muy pequeña, efectos al azar pueden causar que la frecuencia génica cambie entre generaciones. Si solo un pequeño número de gametos contribuyen a la siguiente generación, pueden no ser una selección representativa del pool de genes parental. Esta **deriva genética** puede hacer grandes cambios rápidos en las frecuencias génicas solo cuando la población reproductiva no es mayor de cien individuos.

Cualquiera que sea la frecuencia genotípica inicial en una población, una generación de emparejamientos al azar es suficiente para establecer la distribución de Hardy–Weinberg. Si, cuando se examina una población, la distribución difiere significativamente de la de Hardy–Weinberg, podría significar una de estas cosas:

- *La metodología de examen es defectuosa.* Esto se ve más a menudo cuando se está estudiando un nuevo polimorfismo de ADN. Una distribución de genotipos no Hardy–Weinberg significa que el método de genotipado está dando errores y necesita ser perfeccionado para hacerlo seguro.
- *La selección ya ha ocurrido.* Un genotipo que produce mortalidad prenatal o infantil estará menos representado en una muestra de personas vivas.
- *Los emparejamientos dirigidos son significativos.* Esto podría ser una endogamia o quizá la población no se empareja libremente; consiste en dos o más grupos que tienen diferentes frecuencias génicas y que en gran parte se emparejan entre ellos (estratificación de la población).

Observe que si utiliza un test chi-cuadrado para estudiar si el número de genotipos se adapta a la distribución de Hardy–Weinberg, con dos alelos solo hay un grado de libertad, aunque obtengas tres números observados y esperados. Esto ocurre porque una vez que fijas q, todo las demás sigue los números esperados.

Factores determinantes de frecuencias génicas

En ocasiones pensamos que los caracteres dominantes deben ser frecuentes y los recesivos raros. Actualmente no existe conexión entre la frecuencia génica de un alelo y la producción de un fenotipo dominante o recesivo. La enfermedad de Huntington es un ejemplo de una enfermedad rara dominante y el grupo sanguíneo O de un carácter recesivo frecuente.

Para los caracteres neutros donde la selección no juega un papel, las frecuencias génicas reflejan las frecuencias en los fundadores de esa población, moduladas por la deriva genética si, en un momento determinado, la población reproductiva queda reducida a un pequeño número. La mayoría de los polimorfismos de ADN neutrales frecuentes (SNPs o microsatélites, ver *Capítulo 9*) corresponden a esta categoría. Las mutaciones ocasionales introducirán algunas variaciones al azar cambiando un alelo por otro. Como se explica en el *Capítulo 7*, la deaminación de las citosinas metiladas tiende, durante la evolución, a convertir las secuencias CpG sistemáticamente en TpG, pero este efecto en las frecuencias génicas solo es evidente en una escala temporal grande.

En las enfermedades, las frecuencias génicas reflejan factores adicionales. Las mutaciones recurrentes tienden a incrementar el pool de alelos con pérdida de función, mientras que la selección actúa retirando de la población los alelos alterados. En las enfermedades dominantes y ligadas al X la selección es muy efectiva, porque todas las personas (dominantes), o todos los varones (ligada al X), portadores del alelo de la enfermedad manifiestan la enfermedad y así están expuestos a la selección. En las enfermedades autosómicas recesivas, la selección actúa mucho más despacio, porque la mayoría de los alelos alterados se encuentran en heterocigotos sanos, que no están sujetos a la selección. Por esta razón, los alelos de enfermedades recesivas pueden persistir durante muchas generaciones en una población, incluso aunque la enfermedad sea muy grave. Esto lleva a la importancia de los **efectos fundadores** en muchas poblaciones. Si una población, por muy numerosa que sea actualmente, deriva de un pequeño número de fundadores, o atravesó un cuello de botella cuando solo unos pocos individuos contribuyeron a la siguiente generación, cualquier alelo recesivo que estuviera presente en uno de los fundadores es probable que esté presente en una alta frecuencia en la población moderna. De la misma manera, si un carácter frecuente recesivo normal estuvo ausente en el pequeño grupo de fundadores, será raro o no aparecerá en la población moderna (*Figura 10.2*).

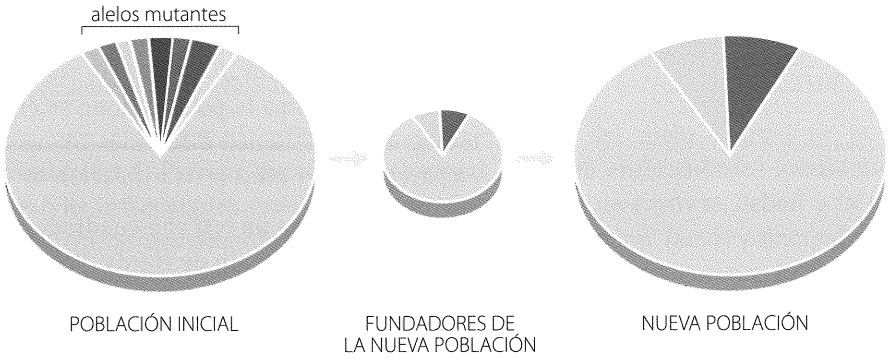


Figura 10.2 – Efectos fundadores.

Los efectos fundadores se han visto en muchas poblaciones. Por las razones expuestas anteriormente, afectan a las frecuencias de los caracteres recesivos pero no a las de los dominantes o ligados al X. La *Tabla 10.1* muestra algunos ejemplos y el *Cuadro de enfermedad 10* describe con mayor detalle algunas enfermedades características de la población judía ashkenazi.

Tabla 10.1 – Enfermedades comunes en ciertas poblaciones, probablemente debidas a un efecto fundador

Enfermedad	OMIM	Modo de herencia	Población	Comentarios
Displasia diastrófica	222600	AR	Finlandeses	90% de los casos finlandeses tienen una mutación donante de empalme en el intrón 1
Aspartilglucosaminuria	208400	AR	Finlandeses	Frecuencia de portadores 1:30; 98% tienen la mutación p.Cys163Ser
Lipofuscinosis	256730	AR	Finlandeses	Mutación única, p.R122W, neuronal ceroide encontrada en el 97% de los casos finlandeses
Síndrome de Hermansky–Pudlak	203300	AR	Puerto Rico	Frecuencia de portadores 1:21; muy rara en la mayoría de otras poblaciones
Síndrome de Bardet–Biedl	209900	AR	Beduinos	Dos formas no alélicas, BBS2 y BBS3 ambas relativamente frecuentes
Distrofia miotónica	160900	AD	Quebec – Sanguenay	Prevalencia 1:500, 30–60 veces más prevalencia en la mayoría de poblaciones
Deficiencia de butirilcolinesterasa	177400	AR	Esquimales de Alaska	Tres alelos diferentes reportados en esta población.
Síndrome de Usher tipo 1C	276904	AR	Franco-acadianos de Louisiana	43/44 casos homocigotos para la mutación c.216G>A
Neuropatía hereditaria motora y sensorial tipo Lom	601455	AR	Gitanos búlgaros	OMIM realiza un comentario interesante

Observe que todas estas enfermedades son autosómicas recesivas (AR) excepto la distrofia miotónica.

Ventaja de la heterocigosis

Existe una segunda razón por la cual una enfermedad recesiva puede ser frecuente en una población. El caso clásico es la enfermedad de células falciformes. Esta es común en muchas poblaciones donde la malaria es o ha sido endémica, pero se encuentra ausente en aquellas donde no es frecuente. La fuerza de la deriva está en que los heterocigotos son relativamente resistentes a la malaria y los homocigotos con la enfermedad de la anemia de las células falciformes mueren a causa de la enfermedad, dando lugar a que los heterocigotos contribuyan desproporcionadamente a la siguiente generación (*Figura 10.3*).

Aunque la ventaja de los heterocigotos sea en grado muy pequeño, si continúa a lo largo de muchas generaciones, puede influir mucho sobre las frecuencias génicas. Si, en relación a heterocigotos Aa, una proporción s_1 de aa y una proporción s_2 de homocigotos AA fracasan en su reproducción, la razón de las frecuencias génicas en equilibrio, q/p, será s_2/s_1. Para la fibrosis quística s_1 es efectivamente 1

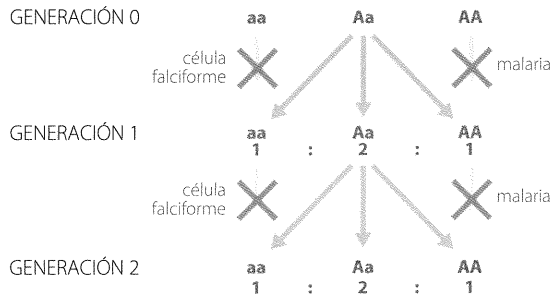


Figura 10.3 – Ventaja de la heterocigosis. Un ejemplo extremo hipotético en el cual todas las personas con la enfermedad de las células falciformes (aa) fracasan en la reproducción debido a su enfermedad, mientras que todos los homocigotos normales (AA) fallan en su reproducción a causa de la malaria. Solo los emparejamientos heterocigoto-heterocigoto contribuyen a la siguiente generación. Sin reparar en cuántas generaciones continúa la selección, el resultado de cada generación será de un 25% de homocigotos con la enfermedad de las células falciformes, 50% de heterocigotos y un 25% de homocigotos normales. Ninguna situación real es tan extrema.

(estamos hablando sobre circunstancias del pasado, no actuales) mientras q/p es 1/45 para las personas de origen noreuropeo. Esto lleva a que s_2 debería ser también alrededor de 1/45. En otras palabras, para explicar la alta proporción de personas del norte de Europa que son portadores de fibrosis quística, los portadores disfrutarían de una ventaja reproductiva del 2% con respecto a los homocigotos normales de siglos pasados. Esta ventaja es muy pequeña para ser fácilmente detectable en un estudio y su naturaleza es controvertida.

¿Ventaja de la heterocigosis o efecto fundador?

Si una enfermedad es frecuente en una determinada población debido a un efecto fundador, esperaríamos que la mayoría de las personas afectadas tuvieran la misma mutación ancestral. Por otro lado, si el mecanismo es la ventaja de la heterocigosis, una serie completa de mutaciones podría ser frecuente. Un buen ejemplo es la β-talasemia en los judíos del Kurdistan. La frecuencia de portadores es mayor del 20%, pero se han descrito 13 mutaciones diferentes para la β-globina en este pequeño grupo. Claramente la ventaja de la heterocigosis (es de suponer que la resistencia a la malaria) está siendo la fuerza conductora en este caso. Por otro lado, entre los Amish del condado de Lancaster, Pennsylvania, el infrecuente síndrome de Ellis–van Creveld (OMIM 225500) es relativamente común, con una frecuencia génica de 0,07. Todas las personas afectas en nueve familias estudiadas tienen los mismos cambios de secuencia en cada copia del gen *EVC* en el cromosoma 4. Siguiendo el rastro llegamos a un ancestro común, una pareja, Samuel King y su mujer, que emigraron en 1744. Este es un ejemplo de efecto fundador. En este caso particular el fundador es relativamente reciente, así pues, el ancestro compartido es demostrable genealógicamente. En la mayoría de los casos tiene que ser deducido mediante la identificación de un haplotipo compartido de polimorfismos no patogénicos en el segmento cromosómico portador del gen mutante. Así sucede que la mutación *EVC* en las familias Amish está siempre acompañada por un segundo cambio de secuencia no patogénico en el gen *EVC*. El cambio no se encuentra en los cromosomas no mutantes. Esto proporciona una confirmación adicional de que estamos buscando copias de un cromosoma ancestral único.

Existen múltiples ejemplos de poblaciones aisladas donde más de una mutación causante de una determinada enfermedad recesiva es relativamente común. La ventaja de la heterocigosis es una explicación probable, pero también podría haber un sesgo observacional. Normalmente las mutaciones se identifican es-

tudiando personas afectas, no haciendo un *screening* de toda una población. Si un alelo alterado es bastante común, habrá muchas personas heterocigotas para ese alelo. Cada vez que una persona es portadora de otro alelo alterado estará afecta, y así ambos alelos serán identificados. De esta forma, un alelo alterado recesivo común proporciona un mecanismo para llamar la atención médica de los alelos raros en una población. Pero, en ocasiones, como algunas de las enfermedades de los judíos que el *Cuadro de enfermedad 10* ilustra, los efectos de la ventaja de la heterocigosis, los efectos fundadores y la deriva genética son difíciles de esclarecer.

10.3. **Estudio de pacientes**

CASO 21 | Familia Ulmer | 251 | **259** | 281 | 376

- Hannah, bebé de 6 meses
- Origen judío ashkenazi
- Enfermedad de Tay-Sachs
- ¿Analizar los hermanos?

Tay-Sachs es una enfermedad de acúmulo lisosomal (ver *Capítulo 8*) causada por la pérdida de hexosaminidasa A. Debido a la deficiencia de la enzima, el ganglíosido G_{M2} se acumula en los lisosomas de los ganglios de la retina y en otras neuronas, produciendo la muerte, a los 2-4 años. La enfermedad es 100 veces más frecuente en los judíos ashkenazi que en los demás grupos. Alrededor de 1 de cada 30 judíos norteamericanos es portador, comparado con 1 de cada 300 en las demás poblaciones. Esto ha llevado a realizar programas de cribado de portadores en las comunidades judías de Estados Unidos como se describe en el *Capítulo 11*. Como sus familias no formaban parte de ninguna comunidad judía, Rachel y Uzi han quedado fuera del cribado.

Después de conocer la enfermedad de Tay-Sachs, Rachel y Uzi estaban muy preocupados por saber si alguno de sus hijos sanos era portador y presionaron para que fueran analizados. El genetista afirmó que no era ético analizar a los niños, ya que el resultado del análisis no tenía implicación para la salud de los niños o su manejo médico. El momento de ofertar el análisis es cuando los niños estén en edad de hacer una elección informada e independiente. Podrían preferir no saber, y no es correcto cerrar esa posibilidad cuando no existe ningún beneficio en analizar al niño. El genetista señaló que cada niño tenía un riesgo de 2 a 3 de ser portador (no de 1 a 2, ver *Cuadro 10.2*).

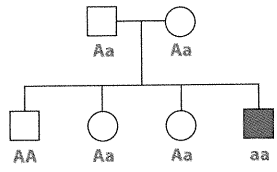
Rachel y Uzi pensaban tener más hijos, y querían hacer un diagnóstico prenatal. Para ello, se tomaron muestras de lavados bucales de ambos y se analizó el gen *HEXA*. Tres mutaciones juntas de *HEXA* cubren el 90% de todas las mutaciones de Tay-Sachs en judíos ashkenazi (*Tabla 10.2*). Rachel y Uzi portan, cada uno, una de estas mutaciones. Rachel tiene una mutación del sitio de empalme del intrón 12 y Uzi tiene una inserción *frameshift* de 4 bp en el exón 11. Hannah era un heterocigoto compuesto para estas dos mutaciones de pérdida de función.

La *Tabla 10.2* muestra los resultados de un estudio que busca sólo las tres mutaciones principales en los portadores de Tay-Sachs ashkenazi. En poblaciones no judías estas mutaciones no son particularmente frecuentes, y otro trabajo ha demostrado la esperada gran variedad de alelos mutantes raros individuales. La situación de los judíos ashkenazi es interesante. Como se explica arriba, si la elevada frecuencia de enfermedad de Tay-Sachs fuera debida a un efecto fun-

Cuadro 10.2

El riesgo de un hermano portador

Si dos portadores de una enfermedad autosómica recesiva tienen un hijo, la probabilidad de que sea afecto es de 1 de cada 4, 1 de cada 2 de que sea portador, y 1 de cada 4 de que sea homocigoto normal. Sin embargo, la probabilidad de que un hermano sano de un niño afecto sea portador, no es de 1 de cada 2, sino de 2 de cada 3. Como muestra la figura, si el niño no es afecto, debe ser uno de los tres de la zona sombreada.



Este es un ejemplo interesante de lo difícil que puede ser descubrir un error cuando este consiste en dar la respuesta correcta a la pregunta equivocada.

- Pregunta correcta: ¿cuál es el riesgo de que un hermano sano sea portador? 2 por cada 3.
- Pregunta equivocada: ¿cuál es el riesgo de que cualquier hijo de una pareja portadora sea portador? 1 por cada 2, pero esta no es la pregunta que han formulado los padres.

dador no podríamos esperar más de una mutación para ser frecuente. Esto es discutido ampliamente en el *Cuadro de enfermedad 10* al final de este capítulo.

Tabla 10.2 – Distribución de las mutaciones de hexosaminidasa A

Mutación	Porcentaje de portadores en ashkenazi (*n* = 156)	Porcentaje en no judíos (*n* = 51)
Inserción de 4 pb en exón 11	73	16
Mutación en sitio de empalme intrón 12	15	0
p.Gly269Ser en exón 7	4	3
No identificada	8	81

Datos de Paw *et al.* (1990) citados en OMIM entrada 272800.

- Niña (Nasreen) de ocho meses, hija de Aadnan y Mumtaz
- Sorda
- Los padres son primos hermanos
- El árbol genealógico sugiere sordera autosómica recesiva

En esta familia altamente consanguínea cabría hacerse una pregunta: si la sordera de Nasreen es autosómica recesiva y si sus dos tíos, Waleed y Mohammed, eran sordos por la misma causa. La pregunta fue contestada (*Sección 9.3*) explotando la estructura familiar para realizar un mapeo de autocigosidad. Esto puso de relieve a un gen candidato, *OTOF*, para el análisis mutacional. La mutación causante fue identificada permitiendo analizar y dar consejo genético a todos los miembros de la familia que lo deseen; lo que es particularmente importante para Waleed y su primo Benazir, que están pensando en casarse.

El mapeo de autocigosidad requiere considerables recursos en el laboratorio y antes de que ella fuera capaz de solicitarlo, el genetista prefería calcular si esas investigaciones extra podrían significar una diferencia sustancial para su consejo. Ella decidió calcular cuál era la probabilidad de que un niño de Waleed y Benazir pudiera ser sordo, asumiendo que todas las sorderas familiares

eran autosómicas recesivas. Quería comparar esto con la baja probabilidad de recurrencia si los casos en la familia eran casuales. En la hipótesis de la recesividad, el hermano de Benazir, Aadnan (el padre de Nasreen, individuo I, en la *Figura 10.4*) era portador. Por lo tanto, uno de los padres de Benazir y Aadnan era portador (presumiblemente su madre, ya que ella era el vínculo con el otro lado de la familia). Así, el riesgo de que Benazir sea portador será 1 de cada 2, y el riesgo total de que un niño de ella y Waleed sea sordo es 1 de cada 4. Este cálculo muestra que existe una gran incertidumbre en el riesgo: alto si la enfermedad de la familia es genética y recesiva, si no es así será mucho más bajo. Está, por lo tanto, totalmente justificado realizar esfuerzos en el laboratorio para tratar de resolver la incertidumbre.

Para un consejo genético más general en parejas consanguíneas, necesitamos calcular los coeficientes de parentesco y consanguinidad.

Cuadro 10.3

Cálculo de los efectos de parentesco

¿Qué proporción de sus genes comparten los parientes?

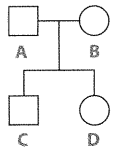
Para los parientes directos la respuesta puede ser intuitivamente obvia:

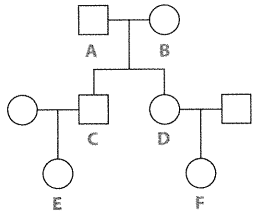
- Padres e hijos comparten la mitad de sus genes (siempre).
- Los hermanos (mismos padres) comparten la mitad de sus genes (por término medio).
- Los hermanastros (un padre en común) comparten un cuarto de sus genes (por término medio).
- Los tíos/tías y sobrinos/sobrinas comparten un cuarto de sus genes (por término medio).
- Los primos hermanos comparten un octavo de sus genes (por término medio).

Si estas cifras no son intuitivamente obvias, o cuando el parentesco es más complicado, el método del coeficiente de la ruta de Sewall Wright es fiable y fácil de seguir:

(1) dibuja el árbol genealógico mostrando el antecesor común y los vínculos con él.
(2) elige un camino entre los dos parientes, a través de un antecesor común y cuenta el número de vínculos.
(3) si ese camino tiene n vínculos contribuye $(\frac{1}{2})^n$ al coeficiente de parentesco.
(4) si existe más de un camino posible, haz lo mismo para cada vía.
(5) suma la contribución de cada vía.

Esto está ilustrado abajo con casos simples de hermanos y primos hermanos, para mostrar que da lugar a la respuesta correcta. Un ejemplo más complicado es el de la *Figura 10.4*.





Hermanos:

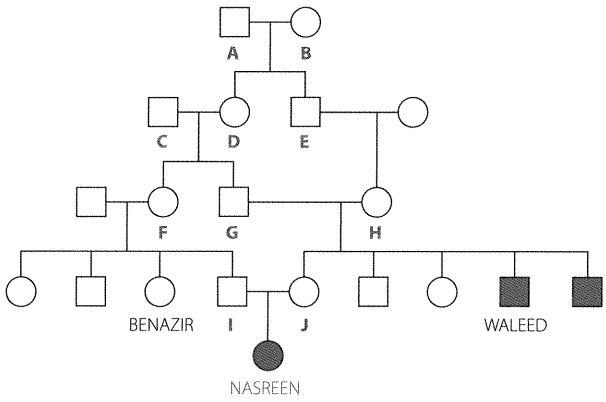
Ruta	**Contribución**
C–A–D	$(\frac{1}{2})^2 = \frac{1}{4}$
C–B–D	$(\frac{1}{2})^2 = \frac{1}{4}$
Total:	$\frac{1}{2}$

Primos hermanos:

Ruta	**Contribución**
E–C–A–D–F	$(\frac{1}{2})^4 = \frac{1}{16}$
E–C–B–D–F	$(\frac{1}{2})^4 = \frac{1}{16}$
	$\frac{1}{8}$

- **El coeficiente de parentesco de dos personas** es la proporción de genes que comparten en virtud de tener uno o más antecesores comunes definidos.
- **El coeficiente de consanguinidad** es la proporción de loci para los cuales se espera que un individuo sea homocigoto debido a la consanguinidad de sus padres. Es la mitad del coeficiente de parentesco de los padres. Igualmente, es la probabilidad de que para cualquier locus dado el individuo reciba dos genes de sus progenitores que son iguales.

El método más fácil para hacer el cálculo es el método del coeficiente de la ruta de Sewall Wright (*Cuadro 10.3*). La *Figura 10.4* muestra cómo se calcula el coeficiente de parentesco de Nasreen. Utilizando el método del coeficiente de la ruta, el coeficiente de parentesco de Aadnan y su mujer Mumtaz se calcula que es 10/64, un poco más cercano que el 1/8 de los primos hermanos. El coeficiente de consanguinidad de Nasreen es entonces 5/64. Observa que incluso los árboles genealógicos con bastante consanguinidad producen coeficientes de consanguinidad bastante moderados. Sin recurrir al incesto, es difícil inventar un árbol genealógico donde un niño tenga un coeficiente de consaguinidad mayor de ¼. Los genetistas que trabajan con ratones utilizan apareamientos repetidos hermano-hermana durante muchas generaciones para producir líneas altamente homocigotas. Solo los faraones del antiguo Egipto hicieron lo mismo en humanos.



COEFICIENTE DE PARENTESCO DE I Y J:

VÍA	PASOS	CONTRIBUCIÓN
I-F-C-G-J	4	$(1/2)^4 = 1/16$
I-F-D-G-J	4	$(1/2)^4 = 1/16$
I-F-D-A-E-H-J	6	$(1/2)^6 = 1/64$
I-F-D-B-E-H-J	6	$(1/2)^6 = 1/64$

coeficiente de parentesco: **10/64**

coeficiente de consanguinidad de Nasreen
= 1/2 coeficiente de parentesco de sus padres = **5/64**

Figura 10.4 – Cálculo del coeficiente de consanguinidad de Nasreen Choudhary (Caso 3). Como existe más de un emparejamiento consanguíneo, no es fácil realizar un cálculo intuitivamente. El método del coeficiente de la ruta se utiliza para calcular el coeficiente de parentesco de los padres de Nasreen.

10.4. Resumen y ampliación

Las frecuencias de las enfermedades genéticas en una población dependen de los efectos contrarios de la mutación y la selección, partiendo de cualquiera que fuesen las frecuencias en la población fundadora inicial.

En las enfermedades dominantes y ligadas al X, las mutaciones normalmente tienen una vida media corta.

- En el caso extremo de una enfermedad dominante letal, todos los casos son debidos a una nueva mutación. Los padres no podrían ser padres si estuvieran afectos. Observa que la letalidad genética significa incapacidad para transmitir sus genes y no necesariamente letalidad física.
- Una mutación suele persistir solo en una o unas pocas generaciones si causa una enfermedad dominante que reduce las oportunidades de una persona de transmitir sus genes, incluso si no impide totalmente la reproducción. Una apariencia poco común o una discapacidad media puede ser suficiente para reducir las oportunidades de éxito de una persona en el mercado del matrimonio. La acondroplasia (OMIM 100800) lo ilustra perfectamente. En 1941 ET Mørch examinó 94075 nacimientos consecutivos en Dinamarca; de ellos, 10 bebés con acondroplasia. Solo dos de ellos tenían un padre acondroplásico, así que asumió que el 80% fueron nuevas mutaciones dominantes. También examinó los adultos acondroplásicos de Dinamarca y encontró que, aunque los adultos acondroplásicos son personas perfectamente fértiles, tienen por término medio solo el 20% de niños que la población normal. Los datos de Mørch han sido cuestionados porque puede haber incluido inconscientemente casos similares de displasias esqueléticas recesivas en su estudio de los recién nacidos. Quizá sus cifras se vean mejor como un experimento ideal. El principio permanece válido y claro. La neurofibromatosis tipo I (*Cuadro de enfermedad 1*) lo ilustra: alrededor del 50% de los casos se deben a mutaciones nuevas.
- En las enfermedades recesivas ligadas al X, la selección es efectiva solo frente a los varones afectos. Si una población tiene aproximadamente el mismo número de mujeres XX y varones XY, un tercio de todos los cromosomas X están en los varones (*Figura 10.5*). Para una enfermedad genética letal como la DMD, significa que uno de cada tres de todos los alelos mutantes DMD desaparecerán en cada generación. Ya que la DMD existe aún, esta pérdida debe estar equilibrada por las nuevas mutaciones. Si la tasa de mutación y selección están equilibradas, un tercio de los casos de DMD sería debido a mutaciones nuevas. Esto tiene una implicación muy importante para la estimación del riesgo. No podemos asumir que la madre de un niño con DMD es portadora; la posibilidad es 2 de cada 3. Únicamente si ella tiene también un hermano afecto u otro pariente materno será una portadora obligada (como Judith Davies en el Caso 4).

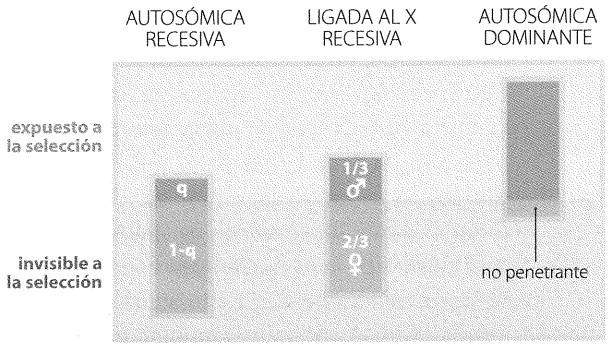


Figura 10.5 – Enfermedades con diferentes modos de herencia tienen diferentes grados de exposición a la selección natural.
Ver el texto para los cálculos.

En los caracteres recesivos, la selección trabaja en los alelos mutantes solo cuando están en la forma homocigota. La proporción de genes en homocigosis con respecto a los que están en heterocigosis es $2q^2 : 2pq$ ($2q^2$ porque hay dos alelos mutantes en cada homocigoto). Asumiendo que p es muy cercano a 1, la razón se simplifica solo a q (*Figura 10.5*). En otras palabras, para una recesiva típica con $q = 0{,}01$, los alelos mutantes están expuestos a la selección solo un 1% de las veces. Evolutivamente, a través del tiempo la selección será eficaz, pero los alelos mutantes pueden unas cuantas generaciones.

El resultado de estas diferentes dinámicas de la selección es que las enfermedades graves dominantes y las ligadas al X es probable que muestren una elevada proporción de mutaciones nuevas y una heterogeneidad alélica extensa. En la mayoría de las enfermedades recesivas, la mutación puede ser reducida cuando se consideran familias y alelos mutantes en individuos que sean frecuentes en una población. Estas consideraciones concuerdan mejor con caracteres de pérdida de función, donde puede haber una heterogeneidad alélica extensa. Los caracteres dominantes son el resultado de mutaciones de ganancia de función, en los cuales una o unas pocas mutaciones específicas pueden originar la enfermedad.

Los genetistas clínicos están más preocupados por las enfermedades frecuentes y graves, y todas ellas de alguna manera deben haber escapado de ser eliminadas por la selección natural. Entre los posibles mecanismos están:

- Elevada tasa de mutación. Un ejemplo es la DMD. Probablemente, la extraordinaria estructura del gen de la distrofina (*Capítulo 3*) contribuye a esto.
- La ventaja de la heterocigosis en una enfermedad recesiva. La Talasemia (Caso 12, familia Lawton) es un claro ejemplo. Como ya se mencionó, la fibrosis quística (Caso 2, familia Brown) debe también tener algo de ventaja heterocigótica, de otro modo no podía ser tan frecuente. De hecho, a menos que exista evidencia de una elevada tasa de mutación, como en la CAH (Caso 19, familia Stott), es razonable suponer que la mayoría de las enfermedades recesivas graves más frecuentes en cualquier gran población, tienen un ligero grado de ventaja heterocigótica.
- Los síntomas aparecen tras alcanzar la edad reproductiva. La enfermedad de Huntington (Caso 1, familia Ashton) es un ejemplo clásico, como lo son los cánceres familiares de mama y colon descritos en el *Capítulo 12*.
- Selección durante la espermatogénesis. Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los casos de acondroplasia se deben a nuevas mutaciones; a pesar de todo, la enfermedad es relativamente común. La tasa de mutación es bastante alta para poder explicarlo. Esto es un poco sorprendente hasta que recordamos que solo un cambio muy específico, p.Gly380Arg en la proteína FGFR3, va a producir acondroplasia (ver figura en *Cuadro 6.3*). La mayor parte de la tasa de mutación A→ a es la suma de las tasas de mutación de cientos de nucleótidos individuales, pero para la acondroplasia el total de la tasa de mutación es la tasa de este único cambio específico. La tasa de mutación en el nucleótido de interés es muchos órdenes de magnitud mayor que la tasa de mutación en casi cualquier otro nucleótido específico de todo el genoma. El examen de la secuencia no sugiere ninguna razón para tan extraordinariamente alta mutabilidad. Se cree que la respuesta es que la tasa de mutación

actualmente no es muy alta, pero las células en la línea germinal masculina que portan la mutación tienen una ventaja selectiva, y así contribuyen desproporcionadamente a la producción de esperma.

¿Cuál es la probabilidad de que la descendencia de un matrimonio consanguíneo tenga una enfermedad recesiva?

Considere a Jack y Jill que son primos hermanos. Suponga que la frecuencia génica de un gen alterado es q. La probabilidad de que Jack sea portador es $2pq$. Para enfermedades raras, p es virtualmente 1, así el riesgo de que Jack sea portador es muy cercano a $2q$. Jill comparte 1/8 de sus genes con Jack en virtud de su parentesco. Esto quiere decir que para cualquier gen de Jack, existe 1 posibilidad de cada 8 de que Hill tenga el mismo gen. Entonces si Jack es portador, la probabilidad de que Jill sea portadora es 1/8. Si ambos son portadores, la probabilidad de que un niño sea afecto es 1 en 4. En total el riesgo es $2q \times 1/8 \times 1/4 = q/16$. La *Tabla 10.3* muestra que en una enfermedad rara el riesgo relativo es mayor para primos hermanos comparado con personas no relacionadas.

Tabla 10.3 – Endogamia y riesgo de enfermedad recesiva

Frecuencia génica de la enfermedad	Riesgo de niño afecto - padres no relacionados	Riesgo de niño afecto - padres primos hermanos	Riesgo relativo primos hermanos
q	q^2	$q/16$	$1/16q$
0,01	1 por cada 10 000	1 por cada 1600	6,25
0,005	1 por cada 40 000	1 por cada 3200	12,5
0,001	1 por cada 1 000 000	1 por cada 16 000	62,5

El cálculo solo es válido para enfermedades raras porque asume que la frecuencia del alelo normal es efectivamente 1 y también que la única forma de que los primos hermanos sean portadores del gen alterado es si ambos lo han heredado de un antecesor común.

Otra manera de verlo, es que la enfermedad recesiva infrecuente, en la mayor parte de los casos, aparece en la descendencia de matrimonios consanguíneos. Como se mencionó antes, significa que el cálculo de frecuencias de portadores de Hardy–Weinberg puede llevar a conclusiones erróneas cuando se aplica a enfermedades raras recesivas.

¿Podemos abolir las enfermedades genéticas?

Los genetistas clínicos tienen muy claro que su objetivo no es eliminar las enfermedades genéticas, y su eficacia no debe ser medida por el número de embarazos anormales a término. Su meta es capacitar a las personas con enfermedades genéticas, o con riesgo de ellas, de llevar su vida de la forma más normal posible, incluyendo el tener familia. Sin embargo, los planificadores de salud

podrían encontrar interesante si como producto del servicio de genética hubiera una reducción de la frecuencia de las enfermedades genéticas.

La discusión anterior sobre las mutaciones y la selección muestra que la abolición de una enfermedad genética no es generalmente una ambición realista. La mayoría de las enfermedades dominantes graves tienen una elevada proporción de nuevas mutaciones, mientras que en las recesivas, la gran mayoría de genes mutantes están en los heterocigotos sanos. Si un dictador de un país decidiera esterilizar a todas las personas con enfermedades genéticas graves, no prevendría la aparición de nuevos casos en la siguiente generación. Incluso continuando con este programa durante muchas generaciones, no tendría éxito. Unas pocas enfermedades dominantes de comienzo tardío como la enfermedad de Huntington podrían ser prevenidas en gran medida, pero la única forma de prevenir las enfermedades recesivas sería esterilizando a todos los portadores. Aunque la frecuencia de portadores para enfermedades recesivas individuales es del orden de 1 por cada 100, OMIM lista miles de enfermedades diferentes, y cada uno de nosotros es portador de varias enfermedades recesivas letales. Un programa de esterilización podría prevenir la enfermedad genética únicamente esterilizando al dictador junto con el resto de la raza humana.

Una cuestión algo diferente es si la medicina a largo plazo está acumulando problemas mediante su efectividad combatiendo la selección natural (ver *Cuadro 10.4*).

Cuadro 10.4

¿Deberían las personas tratadas devolver su deuda a la sociedad no teniendo hijos?

Considérese una enfermedad genética tratable como la fenilcetonuria (PKU; ver **Caso 22, familia Vlasi** en el *Capítulo 11*). Los fenilcetonúricos no tratados son retrasados mentales graves y es probable que pasen sus vidas en una institución. Cuando el tratamiento funciona, una persona afecta es capaz de llevar una vida normal, incluyendo tener hijos. Genéticamente la persona es todavía homocigota para la mutación y cualquier niño heredará un alelo mutante. El tratamiento es caro, ¿debería haber un pacto? ¿Deberíamos decir que estamos de acuerdo en financiar el tratamiento, pero a cambio la persona tratada debería estar de acuerdo en no transmitir sus genes mutados?

La mayoría de los clínicos encontrarían semejante proposición desagradable, pero en el fondo pueden sentirse incómodos como responsables médicos, y quizá deberían enfrentarse al problema. La cuestión debe ser encarada, porque cuando se examina se puede ir mas allá. Se mostró anteriormente que para una enfermedad recesiva la proporción de todos los alelos mutantes que están presentes en personas afectas es q, donde q es la frecuencia génica. En el Reino Unido, la PKU afecta alrededor de una persona de cada 10.000. Entonces q es 0.01. En otras palabras, preocuparse por si un fenilcetonúrico tiene o no derecho a transmitir sus genes es preocuparse del 1% del problema mientras que se pasa por alto el otro 99%. Desde que sabemos que no tenemos influencia del 99%, no tiene sentido preocuparnos por el 1%. Por supuesto, cada vez que un fenilcetonúrico tratado transmite un alelo mutante en vez de no reproducirse, debe incrementar ligeramente la frecuencia de alelos mutantes en la siguiente generación. Tras 100 generaciones, un programa de tratamiento podría duplicar la frecuencia génica. La mayoría de las personas sentirían que la humanidad tiene problemas bastante más graves que abordar los próximos 2500 años que una duplicación de la frecuencia de los alelos mutantes de la PKU.

Enfermedades de judíos y finlandeses

Los judíos ashkenazi y los finlandeses son dos de los ejemplos mejor estudiados de poblaciones con importantes efectos fundadores. Ambos tienen elevados niveles de educación y servicios médicos bien desarrollados que proporcionan buenos datos en el registro y frecuencia de enfermedades genéticas. La *Tabla 10.1* enumera algunas de las enfermedades finlandesas, y la tabla de esta sección muestra algunas enfermedades judías ashkenazi. Motulsky (1995) proporciona una buena revisión concisa de las enfermedades de los judíos.

Algunas enfermedades inusualmente prevalentes entre los judíos ashkenazi

Enfermedad	Número OMIM	Modo de herencia	Frecuencia de portadores	Comentarios
Enfermedad Tay–Sachs	272800	AR	1/30	Tres mutaciones ashkenazi bastante comunes; ver **Caso 21 (familia Ulmer)** y *Capítulo 11*
Disautonomía familiar	223900	AR	1/30	Muy pocos casos reportados en no judíos; el 99,5% de los casos judíos tienen la misma mutación de *splicing*
Enfermedad de Gaucher	230800	AR	1/15	Dos mutaciones ashkenazi comunes p.Asn380Ser (75%) y c.84insG (15%); p.Leu444Pro también frecuente
Enfermedad de Canavan	271900	AR	1/40–1/60	Dos mutaciones ashkenazi frecuentes, p.Glu285Ala y p.Tyr231STOP
Anemia de Fanconi grupo de complementación C	227645	AR	1/90	La mayoría de los casos ashkenazi tienen una mutación en un sitio de empalme en el intrón 4
Enfermedad de Niemann–Pick Tipo A	257200	AR	1/80	Tres mutaciones explican el 65% de los casos ashkenazi
Síndrome de Bloom	210900	AR	1/200?	La mayoría de los casos ashkenazi afectos tienen la misma mutación, deleción de ATCTGA e inserción de TACATTC en el nucleótido 2281
Cáncer de mama familiar	113705 (*BRCA1*); 600185 (*BRCA2*)	AD	Total 2.5%	Tres mutaciones ashkenazi comunes: c.185delAG (1% de la población), c.5382insC (0,15%) en *BRCA1*; c.6174delT (1,5%) en *BRCA2*
Distonía de torsión 1	128100	AD	1/1000–1/300 afectado	Genética heterogénea; muchos pacientes ashkenazi y no judíos tienen la misma deleción de 3 pb

Ambas poblaciones se han expandido mucho a partir de un pequeño número de fundadores.

- De los 13-14 millones de judíos que hay en el mundo, alrededor del 80% son ashkenazi, descendientes de una población que emigró a Rhineland, Alemania, en el siglo IX, y después se trasladó a Polonia, Lituania, Bielorrusia y regiones circundantes. Los ashkenazi son distintos de los sefardíes, que provenían primordialmente de España, Portugal y norte de África, desde hace 1000 años. Hasta hace unos pocos siglos, los sefardíes constituían la mayoría de todos los judíos, y sus comunidades en España y Portugal podrían haber existido desde tiempo de los romanos. La población ashkenazi probablemente tiene unos pocos miles de individuos en el periodo moderno temprano. Motulsky sugiere que una pequeña clase comerciante próspera pudo haber contribuido desproporcionadamente a las generaciones siguientes, produciendo efectos fundadores muy fuertes.
- En Finlandia hubo dos fases de expansión y cada una de ellas podría haber producido fuertes efectos fundadores: una en la época prehistórica temprana, tras su primer asentamiento en el sur del país, y la otra en el siglo XVII, cuando los grupos de pioneros poblaron el enormemente vacío norte (De la Chapelle, 1993).

Ha habido controversia sobre si la distribución de los alelos en las enfermedades de los ashkenazi puede ser explicada solo en términos de historia de poblaciones. Con un simple efecto fundador, se podría esperar un alelo mutante, en un marcador específico en el haplotipo, que explicara el exceso de casos de una enfermedad (exceso comparado con los niveles encontrados en otras poblaciones). Esto es lo que se ve en la disautonomía familiar, la anemia de Fanconi y el síndrome de Bloom. Pero en las enfermedades de Tay–Sachs, Gaucher, Niemann–Pick y Canavan, dos o más alelos son relativamente frecuentes. Esto se debe tomar como una evidencia de la ventaja de la heterocigosis. Es notable que tres de las cuatro enfermedades mencionadas lo sean de depósito lisosomal (Tay–Sachs, Gaucher y Niemann–Pick) y, de hecho, otras enfermedades de depósito lisosomal, como la mucolipidosis IV, son también relativamente frecuente en los ashkenazi. ¿Es solo una coincidencia, o podría haber algo que hiciera que ser portador de una enfermedad de depósito lisosomal fuera ventajoso en algún momento de la historia de esta población?

Un sesgo de observación natural podría explicar algunos de los datos. Por ejemplo, tres mutaciones diferentes BRCA1/2 son bastante frecuentes en los ashkenazi y raras en el resto (ver *Capítulo 12*). Esto parece extraordinario, pero puede ser solo una fluctuación inicial al azar, amplificada por la fuerte expansión poblacional. Antes de pedir una explicación especial, se debería recordar todos los otros genes donde no se encuentran mutaciones frecuentes en los ashkenazi. Quizá no es tan notable que un gen de cada mil deba mostrar una fluctuación al azar lo bastante grande como para producir la distribución presente.

10.5. **Referencias**

De la Chapelle A (1993) Disease gene mapping in isolated human populations: the example of Finland. *J. Med. Genet.* **30**: 857–865.

Motulsky AG (1995) Jewish diseases and origins. *Nat. Genet.* **9**: 99–101.

Paw BH, Tieu PT, Kaback MM, Lim J y Neufeld EF (1990) Frequency of three Hex A mutant alleles among Jewish and non-Jewish carriers identified in a Tay-Sachs screening program. *Am. J. Hum. Genet.* **47**: 698–705.

10.6. Ejercicios de autoevaluación

(1) Un total de 200 personas no relacionadas fueron tipadas para un polimorfismo de un único nucleótido que tiene dos alelos, C y T. y 87 personas fueron CT, 93 TT y 20 CC. ¿Cuáles son las frecuencias génicas de los alelos C y T? ¿Está la población en el equilibrio de Hardy–Weinberg?

(2) El síndrome de Usher Tipo 1 es un síndrome autosómico recesivo de sordera y ceguera que afecta a una persona por cada 100.000 en una población. Aunque todos los casos son clínicamente indistinguibles, el análisis genético ha mostrado que mutaciones en varios genes diferentes pueden causar el síndrome de Usher (heterogeneidad de locus). ¿Cuál es la frecuencia de portadores, (a) si todos los casos son debidos a mutaciones en un único locus, y (b) si la homocigosidad en cualquiera de los 10 loci diferentes contribuyen igualmente a elevar la incidencia total?

(3) La incapacidad de probar bajas concentraciones de sustancias amargas, como la feniltiourea y quizás algunos tipos de coles suele ser un rasgo autosómico recesivo. Las personas pueden ser clasificadas como probadores o no probadores. Al 64% de las personas de una población no les gustan las verduras de primavera y no quieren comerlas porque les saben desagradablemente amargas. ¿Cuál es la frecuencia del alelo del gusto?

(4) Como se mencionó en el *Cuadro de enfermedad 8*, la protoporfiria eritropoyética funciona como una enfermedad dominante con penetrancia reducida, pero el análisis molecular ha demostrado que las personas afectas son todas heterocigotos compuestos, que tienen un alelo raro no funcional y uno común de baja funcionalidad (q = 0,11 en Francia). Si la enfermedad afecta a 1 persona de cada 30.000 en Francia, ¿cuál es la frecuencia del alelo no funcional? ¿Cuál es el riesgo de que una persona afecta, casada con una persona no afecta, tenga un hijo afecto?

(5) El único hijo de una mujer tiene distrofia muscular de Duchenne. Ella no tiene hermanos ni hermanas, y no hay historia de esta enfermedad en el resto de la familia. ¿Cuál es la probabilidad de que su hija sea portadora?

(6) La hermana sana de un niño con fibrosis quística se casa con un hombre no relacionado en cuya familia no hay historia de la enfermedad. Ambos son daneses, ella está embarazada. ¿Cuál es el riesgo de que el niño tenga fibrosis quística? ¿Si te hubiera consultado con anticipación, le hubieras aconsejado no tener hijos?

(7) Una enfermedad autosómica recesiva afecta a una persona de cada 40000. El matrimonio de una mujer se rompe bajo el estrés de cuidar a su hijo afecto. Encuentra consuelo en un primo comprensivo; con el tiempo se casan y ahora está embarazada. ¿Cuál es el riesgo de que su hijo esté afecto?

(8) Fred tiene una enfermedad autosómica recesiva extremadamente rara. ¿Cuál es la probabilidad de que sus abuelos fueran ambos portadores?

(9) Waleed y Benazir (*Figura 10.4*) se casan y tienen un hijo sordo, Aziz. Las personas sordas normalmente prefieren casarse con compañeros sordos, y Aziz se casa con Nasreen Choudhary. ¿Cuál es la probabilidad de que su primer hijo sea sordo? Calcula el coeficiente de cosanguinidad de este niño. Aparte de la sordera, ¿tiene un alto riesgo de padecer otras enfermedades recesivas?

Capítulo **11**

¿Cuándo es útil el cribado?

Conceptos y habilidades que aprenderá en este capítulo

Después de estudiar este capítulo será capaz de:

- Distinguir entre cribado y diagnóstico.
- Describir los parámetros comúnmente utilizados para definir el desarrollo de un programa de cribado.
- Describir los requerimientos técnicos, sociales y éticos que debe cumplir un programa de cribado.
- Dar ejemplos de programas de cribado prenatal, neonatal y postnatal, y discutir sus ventajas e inconvenientes para los individuos y para la sociedad.

11.1. Historias clínicas

CASO 22 | Familia Vlasi | **271** | 276 | 376

- Valon, niño de 6 años
- Problemas graves de aprendizaje
- Pequeño, microcefálico, ojos azules, piel y pelo claros, eczema; hiperactivo
- ? Fenilcetonuria



Figura 11.1 – Un paciente con fenilcetonuria no tratada.

Valon, de seis años, es el único hijo de Adem y Flora Vlasi, que han tenido una vida muy poco sedentaria y viajaron a Australia como refugiados. Valon nació en Kosovo. La familia vivía en un área rural remota donde solo eran posibles los cuidados médicos básicos. Pronto, tras el nacimiento, la situación política se volvió inestable y la familia tuvo que trasladarse varias veces antes de marcharse a Australia como refugiados. Al pasar los años, Adem se preocupó por el desarrollo de Valon, pero Flora decía que los problemas se debían probablemente a todos los desplazamientos que habían sufrido y al hecho de que no había ido al colegio. Cuando se establecieron y Valon empezó el colegio, los profesores se dieron cuenta a la primera de que el niño tenía serios problemas de aprendizaje. Buscaron asesoramiento en un psicólogo educacional y sugirieron que el médico de la familia le remitiera a un pediatra. En la clínica el doctor se sorprendió al ver que Valon tenía una enfermedad de la que solo había oído hablar en los libros. Valon era pequeño, microcefálico, con ojos azules, piel y pelo muy claros, y con eczema. Era hiperactivo y cuando se le frenaba, balanceaba su cuerpo. El pediatra también pensó que Valon tenía olor a moho, como si sus padres lo tuvieran descuidado. El doctor tenía la sospecha fundada de que Valon tenía fenilcetonuria y pidió que le midieran el ácido fenilpirúvico en una muestra de orina y los niveles de fenilalanina en sangre.

11.2. Antecedentes

El cribado frente a los tests diagnósticos

La palabra "cribado" se utiliza a menudo de forma inconveniente como sinónimo de análisis, pero la esencia de un verdadero programa de cribado es que se aplica a toda la población. A diferencia de los tests diagnósticos, en los que una persona que tiene un problema acude al clínico para un análisis, el cribado es normalmente un proceso de arriba a abajo, ofrecido por alguna organización a una gran cohorte de personas (definida probablemente por edad, estado reproductivo u origen étnico).

En todos los programas de cribado genético, las consideraciones éticas son al menos tan importantes como las técnicas. En esta sección consideraremos algunos de los problemas técnicos más sencillos y volveremos sobre algunas cuestiones más generales en la sección final de este capítulo.

La mayoría de los test de cribado no dan lugar a un diagnóstico definitivo, pero sirven para definir grupos de personas de alto riesgo a las que se les ofrece un diagnóstico definitivo. Normalmente, esto implica establecer un punto de corte arbitrario (*Figura 11.2*), lo que siempre es un compromiso.

Establecer un punto de corte muy elevado significa perder de forma inaceptable una gran proporción del grupo diana, mientras que establecer uno demasiado bajo significa exponer a demasiadas personas a la investigación, la mayoría no susceptible de ser afectas. Los cribados poblacionales para mutaciones de enfermedades mendelianas son inusuales, y en ellos se da un diagnóstico final en un único paso y, en teoría, no debería producir falsos positivos. Sin embargo, incluso los programas de cribado de este tipo rara vez confían en un análisis mutacional como primera línea de investigación y los pasos iniciales pueden dar lugar a falsos positivos; en cualquier caso, se producirán falsos negativos porque ningún test de cribado de ADN puede identificar todas las mutaciones posibles de un gen. El *Cuadro 11.1* muestra algunas de las medidas utilizadas para definir la validez de un test de cribado.

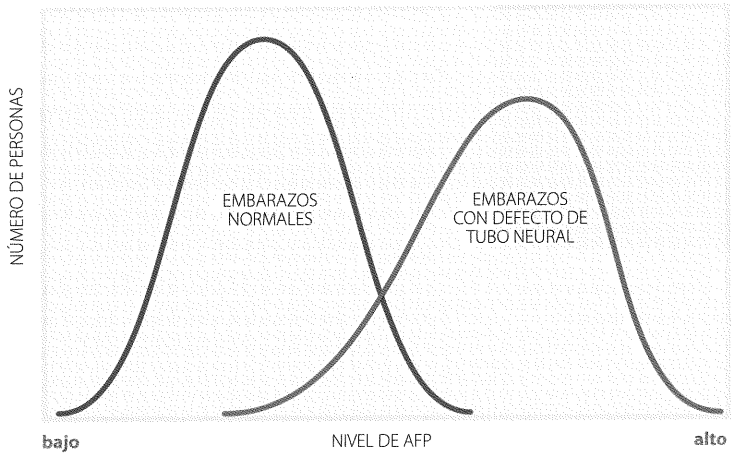


Figura 11.2 – Un test de cribado típico.
En muchos hospitales se ofrece a las mujeres embarazadas el test de cribado en suero materno de la fetoproteína para calcular el riesgo de que el feto tenga un defecto de tubo neural (espina bífida o anencefalia). Un nivel incrementado de AFP en sangre materna indica un riesgo elevado, pero las distribuciones en embarazadas normales y afectas se solapan. Se utiliza un punto de corte arbitrario para seleccionar alrededor del 5% de mujeres en las que se ampliará la investigación. Lo que implica un examen ecográfico detallado y/o amniocentesis (ver *Capítulo 14*). Muchas de las mujeres con AFP elevada tienen niños normales.

Cuadro 11.1

Parámetros de un test de cribado

Considerando, como ejemplo, el test de MSAFP mostrado en la *Figura 11.2*, las mujeres pueden ser positivas o negativas para el test, y pueden tener un feto con o sin defecto en el tubo neural (NTD). En la tabla a, b, c y d son números reales de mujeres en cada categoría.

	Feto con NTD	**Feto sin NTD**
Test positivo	**a**	**c**
Test negativo	**b**	**d**

Sensibilidad del test = proporción de afectos encontrados = a / (a+b)

Especificidad del test = proporción de los no afectos que son verdaderos negativos = d / (c+d)

Tasa de falsos positivos = proporción de todos los tests que dan un falso positivo = c / (a+b+c+d);
O = proporción de tests positivos que eran falsos = c / (a+c)

Tasa de falsos negativos = proporción de tests negativos que eran falsos = b / (b+d)

Valor predicitivo positivo = proporción de todos los positivos que son afectos = a / (a+c)

Riesgo relativo = riesgo tras un test positivo comparado con el riesgo de la población general
= [a / (a+c)] / [(a+b) / (a+b+c+d)]

¿Cuándo se debe hacer el cribado?

Se pueden dividir los test de cribado en tres grupos:

- **Cribado prenatal**: a las mujeres embarazadas en Reino Unido, por ejemplo, se les ofrece el cribado de NTDs y síndrome de Down. Los programas de cribado para la talasemia y la enfermedad de las células falciformes están siendo introducidos. Puede hacerse, además, un cribado más general de las anomalías fetales, consistente en un cuidadoso examen del feto mediante ultrasonidos. Esto debería llevar a encontrar más NTDs, junto a otras anomalías, haciendo innecesario el test MSAFP de forma separada. El cribado para el síndrome de Down es discutido en relación al Caso 8 (familia Howard) en la *Sección 11.3*. Muchas enfermedades individuales mendelianas y cromosómicas también son detectables prenatalmente, pero no hay test de cribado poblacional; se ofrece a parejas individuales de alto riesgo debido a su historia familiar.
- **Cribado de recién nacidos:** todos los lactantes recién nacidos son sometidos a un cribado para la fenilcetonuria. Una gran variedad de tests pueden ser ofrecidos de rutina (ver *Sección 11.4*). La lista difiere en los diferentes países y, a menudo, entre instituciones dentro de un mismo país. En el Reino Unido, el cribado de recién nacidos para hemoglobinopatías, hipotiroidismo congénito y fibrosis quística está establecido o siendo introducido, y se están realizando pilotos a gran escala para la deficiencia de la cadena media de la acil-CoA deshidrogenada (MCAD).
- **Cribado en adultos**: este es más adecuado para conocer los portadores en enfermedades recesivas, por ejemplo, el cribado de portadores de Tay-Sachs

en judíos ashkenazi (ver *Sección 11.3,* Caso 21, familia Ulmer). Grupos particulares de adultos pueden ser cribados para otros factores de riesgo genético. Por ejemplo, familias con una historia familiar importante de cáncer de mama son cribadas para las mutaciones BCRA1/2 (ver *Capítulo 12*) y las personas con altos niveles de colesterol pueden ser cribadas para hipercolesterolemia genética (ver *Cuadro de enfermedad 11*). Como se describe en el *Capítulo 8*, el cribado para variantes farmacogenéticas que afecten al metabolismo de medicamentos se plantea con frecuencia y quizá sea más común a lo largo de los años venideros.

El cribado de portadores para una enfermedad recesiva podría ser llevado a cabo en recién nacidos, en chicos que han terminado la educación secundaria, en parejas en edad de tener hijos en mujeres embarazadas y sus parejas o en cualquiera que acude a un centro. Los puntos a considerar incluyen:

- ¿Pueden dar los sujetos un consentimiento informado?
- ¿Cuál es la dificultad para acceder al grupo de cribado?
- ¿Cuál será la relevancia de la información para la persona cribada?
- ¿Cuáles son las implicaciones prácticas y éticas de un resultado positivo?
- ¿Cuál será el coste del programa? y ¿justifican los beneficios el coste?

Estas consideraciones se discuten un poco más abajo en relación al cribado de portadores de Tay-Sachs.

¿Quién debería ser cribado?

El cribado puede ofrecerse a toda la población o a grupos específicos. Cuando el cribado para el síndrome de Down fue restringido a mujeres mayores debido a su mayor riesgo (ver *Tabla 2.1*), algunas mujeres jóvenes que tenían hijos con síndrome de Down se quejaron de que estaban siendo injustamente discriminadas. Los planes de cribado de grupos étnicos específicos a menudo causan problemas. En el Reino Unido, todos los lactantes son sometidos a cribado para la enfermedad de las células falciformes, y se ofrece el cribado a todas las mujeres al principio del embarazo, incluso aunque el riesgo para los británicos de raza blanca es extremadamente bajo; sin embargo, la metodología usada depende del nivel de riesgo de la población local.

En otros casos el cribado se basa en la historia familiar. Esto se hace por razones económicas. Rastrear los genes *BCRA1* y *BRCA2* enteros buscando mutaciones es muy caro y en el sistema de salud británico priorizan la realización de análisis basados en la historia familiar. Estos análisis y el cribado en cascada (ver *Cuadro de enfermedad 11*) representan el camino intermedio entre el estudio basado en la genética clínica de la familia y el cribado poblacional.

¿Cómo se debería hacer el cribado?

Un análisis de ADN rara vez es el mejor test de cribado. Los test de ADN rápidos y baratos que serían mas deseables para un cribado a gran escala siempre analizan mutaciones específicas (ver *Capítulo 5*). Sin embargo, lo que normalmente queremos saber es si existe alguna mutación, no solo alguna de las específicas.

Para enfermedades de pérdida de función con extensa heterogeneidad alélica, normalmente es más eficiente utilizar un test funcional para un cribado a gran escala. El cribado de la PKU se basa en medir el nivel de fenilalanina en una gota de sangre; el cribado de Tay-Sachs normalmente mide la capacidad de la enzima afecta para romper un sustrato artificial; el cribado de la fibrosis quística se realiza midiendo el nivel de tripsina inmunorreactiva, a pesar de que para el cribado de portadores hay que utilizar necesariamente un test de ADN.

11.3. **Estudio de pacientes**

CASO 8 | Familia Howard | 26 | 38 | 68 | 100 | **275** | 376

- Helen, hija recién nacida de Henry y Anne (33 años)
- Síndrome de Down
- ¿Riesgo de recurrencia si tienen más hijos?

El cribado solo por la edad materna tiene una sensibilidad muy baja. Aunque el riesgo individual es mayor para una mujer de más de 38 años, hay muchos más embarazos entre las mujeres jóvenes y, por eso, la mayoría de los niños con síndrome de Down nacen de mujeres jóvenes. Para mejorar la sensibilidad, se miden varias sustancias en la sangre materna. Para cada una, la distribución de los niveles en los embarazos con síndrome de Down (tras ajustar la edad gestacional y el peso materno) es bastante diferente a los embarazos normales. El nivel de AFP en los embarazos con síndrome de Down supone el 70% del nivel en embarazos no afectos. El nivel de estriol no conjugado supone en promedio alrededor del 75%. Por otro lado, los niveles de la gonadotropina coriónica humana tienden a aumentar. Todos los síndromes de Down y las distribuciones normales se solapan, así que ninguno de los niveles es diagnóstico por sí solo, pero en combinación, e incluyendo la edad materna, forman el "triple test" que da una composición de riesgo que es mucho más predictiva que únicamente la edad. Otro test adicional utilizado en algunas instituciones es la medida mediante ultrasonidos del líquido que hay bajo la piel del cuello del feto; aquellos fetos con síndrome de Down suelen tener mas líquido, dando lugar a una mayor translucencia nucal.

El cribado prenatal para el Síndrome de Down (y otras anomalías cromosómicas) se viene realizando desde hace años. Hasta 1980 el cribado consistía en preguntar la edad de la madre. Como muestra la *Tabla 2.1*, el riesgo de tener un niño con síndrome de Down aumenta bruscamente para las mujeres mayores. A partir de un punto de corte (normalmente en el rango de 35-38 años, dependiendo de los recursos disponibles) a las mujeres se les ofrece un diagnóstico prenatal definitivo. El test implica utilizar la amniocentesis o (más recientemente) la biopsia de vellosidades coriales para obtener una muestra de células fetales para análisis citogenético. Estos procedimientos son invasivos, desagradables para la mujer y tienen un riesgo de aborto del 0,5-2%. También son caros. Solo son apropiados en mujeres de alto riesgo. El punto de corte de la edad materna sitúa alrededor del 5% de las mujeres en este grupo.

A aquellas mujeres cuyo riesgo combinado es mayor de un determinado límite se les ofrece el test diagnóstico. Decidir qué punto de corte utilizar implica un equilibrio entre la sensibilidad y los falsos positivos. Ningún incremento en la sensibilidad estará acompañado de un descenso en la especificidad. La función de un test puede ser juzgada, en parte, por cómo varía el coste-beneficio. La

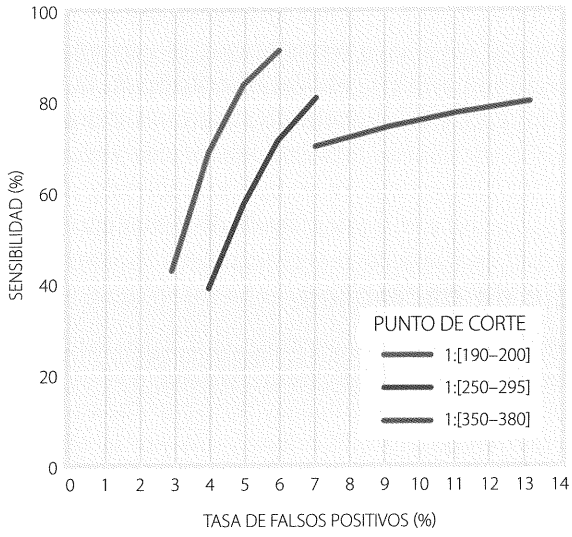


Figura 11.3 – Curvas ROC para la realización del triple test del síndrome de Down como test de cribado. Existe un equilibrio entre sensibilidad (recogido del gran número de embarazos afectos) y tasa de falsos positivos (sometiendo muchos embarazos no afectos a análisis prenatales invasivos). Procedente de Conde-Agudelo y Kafury-Goeta (1990) con permiso de Lippincott Williams y Wilkins.

Figura 11.3 muestra los cálculos teóricos de cómo el coste-beneficio del triple test podría hacerse para diferentes puntos de corte del riesgo. Por razones históricas cada curva se denomina curva ROC *(receiver operating characteristic)*. Desde abril de 2007, a todas las mujeres embarazadas del Reino Unido debería ofrecérseles un test con un ratio de detección de alrededor del 75% y un ratio de falsos positivos menor del 3%.

A mujeres como la madre de Helen, Anne, que tiene un niño previo con síndrome de Down, se les debería ofrecer un test diagnóstico a pesar de su edad o su nivel de riesgo objetivo. Aunque el riesgo de recurrencia en una mujer joven es bajo, su nivel de ansiedad es, naturalmente, muy alto tras haber tenido un niño afecto y sería desconsiderado no realizarle el análisis.

Existe un debate considerable sobre el test más apropiado una vez que se han obtenido las células fetales (*Cuadro 11.2*). Como se describe en el *Capítulo 4*, Anne Howard optó por el análisis mediante FISH en interfase y recibió un resultado normal tranquilizador en solo dos días, pero tuvo que entender que esto no quería decir que su feto fuera cromosómicamente normal; únicamente, que tenía el número correcto de copias de los cromosomas 13, 18 y 21.

CASO 22 | Familia Vlasi | 271 | **276** | 376

- Valon, niño de 6 años
- Problemas graves de aprendizaje
- Pequeño, microcefálico, ojos azules, piel y pelo claros, eczema; hiperactivo
- ? Fenilcetonuria
- ¿Test para el siguiente hijo?

Cuando la familia fue a Sidney, Flora ya estaba embarazada de 6 semanas. Sabiendo que Valon tenía una enfermedad genética grave, ella y Adem estaban muy preocupados por el riesgo que tenía el nuevo bebé de ser afecto. Con todos sus problemas, sentía que no podrían hacer frente a un segundo niño afecto y discutieron poner fin al embarazo a pesar de sus reservas frente al aborto. Cuando su médico de familia les explicó que, incluso si el bebé estuviera afectado (riesgo de 1 de cada 4), podría ser tratado, pidieron el tratamiento para Valon, pero el médico les explicó que el tratamiento solo era efectivo si empezaba muy pronto tras el nacimiento (ver *Capítulo 14*). Así que preguntaron si el nuevo

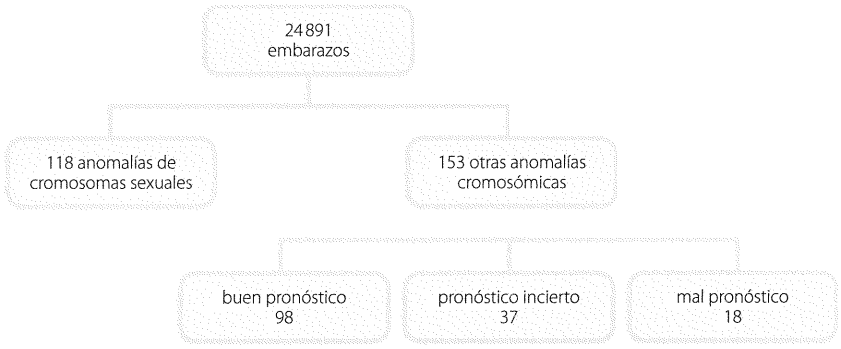
Cuadro 11.2

¿Cuál es el mejor diagnóstico prenatal para el síndrome de Down?

Tras el cribado prenatal mediante el triple test y/o la translucencia nucal, a las mujeres cuyo riesgo de tener un bebé con síndrome de Down esté por encima del límite se les ofrece un test diagnóstico. Las células fetales se obtienen mediante amniocentesis o biopsia de vellosidades coriales, como se describe en el *Capítulo 14*. ¿Cuál es el mejor camino para analizar estas células?

- El *cariotipo convencional*, como se describe en el *Capítulo 2*, puede detectar todas las anomalías cromosómicas posibles, pero puede ser no deseable. Mientras que las trisomías autosómicas son siempre patológicas, otras anomalías pueden provocar decisiones difíciles en las parejas, a las que puede que no quieran enfrentarse. Algunas anomalías, como el síndrome de Turner o el XYY son bien entendidas y con consecuencias relativamente menores, mientras los efectos de otras, como los reordenamientos *de novo* aparentemente equilibrados o los mosaicismos de pequeños cromosomas extra sin identificar (marcador), son impredecibles. ¿Quizás es mejor no saberlo? La figura muestra algunos datos encontrados en cariotipos completos.
- Los *tests moleculares* analizan específicamente las trisomías más comunes, las de los cromosomas 13, 18 y 21. La técnica utilizada puede ser FISH en interfase (ver *Capítulo 4*) o la PCR cuantitativa. Ambos métodos se pueden aplicar en células sin cultivar, evitando la larga espera requerida mientras se produce el crecimiento celular para realizar la citogenética convencional.

En un estudio hecho en el Reino Unido, el análisis del cariotipo completo dura 12 días y cuesta 253£ por test; la PCR cuantitativa se realiza en 24 horas y cuesta 30£ por test. Alrededor de 10% de las anomalías que no se diagnostican con tests rápidos tienen un mal pronóstico. Algunos se detectarán en un examen ecográfico y otros se abortarán, pero algunos darán lugar a niños anormales.



Anomalías cromosómicas encontradas en estudios de cariotipo completo en muestras prenatales que no habían sido detectadas mediante análisis moleculares para trisomías. Datos de 24.891 mujeres analizadas por riesgo elevado de síndrome de Down, de Ogilvie *et al.* (2005).

bebé podría ser analizado tan pronto como naciera, y estar seguros de que así sería. Flora dio a luz una niña sana, y ambas fueron dadas de alta. Unos días más tarde la comadrona fue a su casa. Al mismo tiempo que observaba la salud y el progreso de madre e hija, pinchó al bebé en el talón para recoger un poco de sangre en una tarjeta especial (una tarjeta Guthrie). Esta es una práctica estándar para todos los lactantes nacidos en muchos países sin tener en cuenta la historia familiar. La tarjeta fue enviada al laboratorio central y allí se midió el nivel de fenilalanina en sangre. Aunque habría sido más fácil tomar la muestra de sangre mientras el bebé estaba todavía en el hospital, no se hizo porque mientras está

en el útero, la fenilalanina de un lactante fenilcetonúrico es aclarada a través de la placenta de la madre (quien se espera que sea heterocigota fenotípicamente normal); ver *Figura 11.4*. Solo después de romper la conexión placentaria el nivel de fenilalanina empieza a elevarse en un lactante fenilcetonúrico. Lleva unos días observar un nivel elevado realmente aparente. El tiempo óptimo es el 5º día, aunque en países sin sistemas de salud integrados, el mejor procedimiento es tomar la sangre a las 24-48 horas, mientras la madre y el lactante permanecen todavía en el hospital.

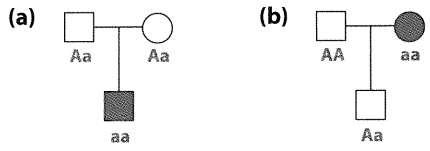


Figura 11.4 – Mientras está en el útero, el nivel de fenilalanina en un feto está determinado por el genotipo de la madre y no por el suyo propio.
(a) Un feto fenilcetonúrico se desarrolla de forma normal en el útero porque la madre aclara el exceso de fenilalanina a través de la placenta. (b) Debido a que el elevado nivel de fenilalanina en la circulación materna atraviesa la placenta, el feto normal de una madre fenilcetonúrica puede nacer con graves daños en el cerebro y microcefalia, a menos que la madre lleve una dieta baja en fenilalanina durante todo su embarazo.

Los laboratorios utilizan varios métodos para analizar el nivel de fenilalanina, incluyendo el ensayo de crecimiento bacteriano, cromatografía, fluorimetría o espectrometría de masas en tandem. La última tiene la ventaja de permitir la medida de otros analitos al mismo tiempo (ver *Tabla 11.3*). No se utiliza un análisis de ADN en esta etapa porque existen muchas mutaciones posibles en el gen *PAH*. Tampoco un ensayo directo de la enzima porque requiere una biopsia de hígado. Cualquiera que sea el método, es un test de cribado y no un test diagnóstico. El punto de corte para el test de cribado normalmente se sitúa alrededor de 120 µM (rango normal 58 ± 15 µM). Los lactantes cuyo nivel en sangre está por encima del límite son llamados para realizar análisis más específicos. En la PKU el nivel es típicamente superior a 1000 µM. Más bajo, pero todavía elevado, es el nivel que se observa en lactantes con hiperfenilalaninemia benigna. Estos lactantes se desarrollan normalmente sin tratamiento. El test de cribado tiene una sensibilidad de alrededor del 98–99% para la PKU, lo que proporciona que no se desarrolle pronto tras el nacimiento. A los lactantes en los que se demuestra que tienen PKU se les pone una dieta especial, como se describe en el *Capítulo 14*. Un seguimiento cuidadoso de la dieta asegura que el niño crezca sin perjuicios cognitivos o que estos sean mínimos.

La fenilalanina hidroxilasa requiere de un cofactor esencial, la tetrahidrobiopterina (BH_4). Un pequeño porcentaje de los niños fenilcetonúricos tienen un defecto genético en la producción o en el reciclaje de BH_4, en lugar de mutaciones en el gen *PAH*. Estos niños requieren un tratamiento diferente porque la BH_4 se requiere para las hidroxilaciones de otros aminoácidos. El laboratorio se esfuerza en analizar esas variantes de PKU y, a menudo, incluyen estudios de ADN para definir las mutaciones en el gen *PAH*.

CASO 4 | Familia Davies | 4 | 10 | 66 | 102 | 151 | 181 | **279** | 376

- Niño (Martin) de 24 meses, hijo de Judith y Robert
- Torpe y lento al caminar
- Historia familiar de distrofia muscular
- El árbol genealógico muestra herencia recesiva ligada al X
- Solicitud de test diagnóstico de ADN
- Mutación *frameshift* en el gen de la distrofina
- ¿Cribado de todos los niños recién nacidos?

Martin no fue diagnosticado hasta que tuvo dos años, cuando se hizo patente su forma de caminar despacio y con torpeza. A veces cuando se diagnostica el primer hijo ya ha nacido un segundo niño afecto. Esto lleva a sugerir que todos los niños recién nacidos deberían ser cribados. Técnicamente, se podría realizar de una forma barata, midiendo en suero la creatinquinasa, que está fuertemente elevada en los afectos (ver *Capítulo 4*). Los varones con una elevada creatinquinasa podrían ser analizados por PCR multiplex para un cribado de deleciones, lo que encontraría unos dos tercios de los casos. Para el resto se requerirá una biopsia de músculo, para demostrar la ausencia de distrofina.

La propuesta ha sido controvertida. Un pequeño número de casos repetidos se podría evitar; por otro lado, hacer un diagnóstico temprano tan grave, y cuando no existe un tratamiento útil, roba a la familia un par de años de feliz paternidad. También existe la pregunta de cuántos chicos no afectos cuya creatinquinasa estaba elevada por alguna razón serán sometidos a una biopsia de músculo, y el trauma que supone para los padres de lactantes con tests inicialmente positivos pero que finalmente no parecen ser afectos. El cribado neonatal de DMD se ha limitado hasta ahora a algunos pequeños programas experimentales locales.

CASO 2 | Familia Brown | 2 | 8 | 65 | 126 | 151 | **279** | 376

- Niña de seis meses (Joanne), hija de David y Pauline
- ? Fibrosis quística
- ¿Solicitud de test molecular?
- Definir mutaciones en el gen CFRT
- ¿Cribado universal de recién nacidos?

Los padres de Joanne, David y Pauline, provienen de familias bastante grandes (*Figura 1.8*). Sus parientes tienen un riesgo claro de ser portadores de la fibrosis quística. En el momento en que sabemos qué mutaciones tienen David y Pauline (*Capítulo 5*), es bastante fácil analizar esas mutaciones específicas en los parientes que lo deseen. Este es un ejemplo de **cribado en cascada** (ver *Cuadro de enfermedad 11*). Como las mutaciones de la fibrosis quística son frecuentes en la población general es prudente analizar también las mutaciones más frecuentes, ya que puede que exista un portador que haya heredado un gen mutante de un antecesor diferente del de las mutaciones de David y Pauline.

Como la enfermedad recesiva grave más frecuente en las poblaciones de origen europeo, la fibrosis quística ha sido considerada para hacer un cribado de la población general además de cribado en cascada. Esto podría incluir cribado de recién nacidos para detectar lactantes afectos y/o de adultos para detectar portadores. El argumento para el cribado de recién nacidos es que un tratamiento temprano mejora el pronóstico. En el Reino Unido el Comité Nacional de Cribado ha aceptado este argumento y ha recomendado la introducción de un cribado de recién nacidos universal. El método está basado en la medida de tripsina inmunorreactiva (IRT), la cual está incrementada en la fibrosis quística. La *Figura 11.5* muestra el diagrama de flujo del método.

Para el cribado de portadores es necesario un test de ADN, porque los portadores son bioquímicamente normales. El problema es el gran número de mutaciones que se han descrito (más de 1000). Como se apunta en la *Sección 5.4,* es fácil buscar una mutación específica, pero es complicado hacer lo mismo para

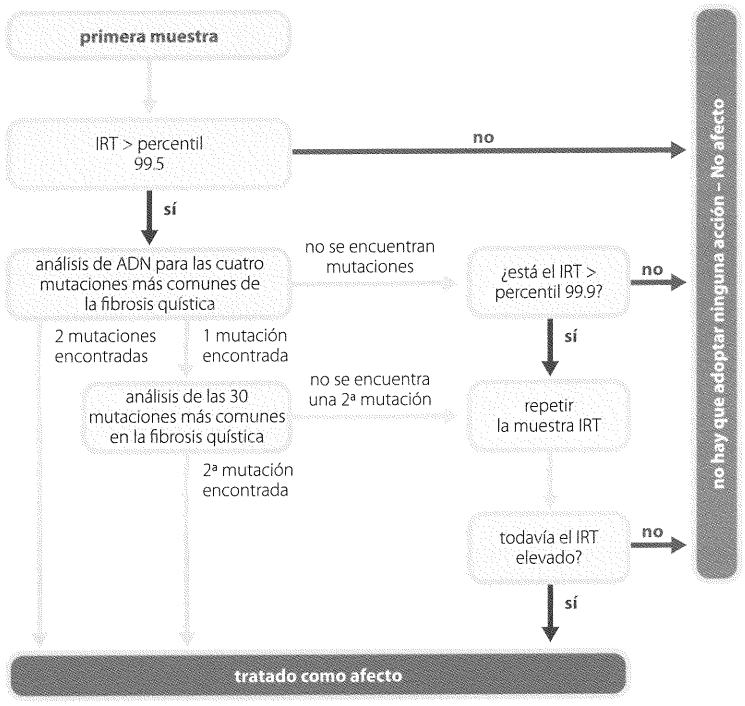


Figura 11.5 – Diagrama de flujo del plan propuesto en el Reino Unido para el cribado de recién nacidos para la identificación temprana y tratamiento de aquellos con fibrosis quística. IRT, tripsina inmunorreactiva.

cualquier mutación posible. El gen *CFTR* tiene 27 exones (ver *Figura 3.8*) y actualmente no hay un método para escanear la secuencia entera de cada gen a un coste lo bastante bajo como para poder utilizarlo en un cribado poblacional. Debido a los efectos fundadores (*Capítulo 10*) unas pocas mutaciones específicas forman el grueso de las mutaciones de fibrosis quística en cualquier comunidad particular. Cualquier protocolo de cribado de portadores implica un equilibrio entre coste y sensibilidad. Analizar las mutaciones más comunes es barato, pero se pierde una proporción de portadores. Analizar muchas mutaciones es caro, y aunque se chequean múltiples mutaciones individuales, la sensibilidad nunca será del 100%. La *Tabla 11.1* muestra la distribución de las mutaciones de *CFTR* detectadas por un gran laboratorio en el Reino Unido.

Inevitablemente, algunas parejas analizadas con resultado negativo son en realidad portadoras, con 1 posibilidad de cada 4 de tener un hijo afecto. Casi todas estas parejas sabían que uno de los dos era portador, pero el otro portaba una mutación rara y el resultado de su test daba lugar a un falso negativo. Si la frecuencia de portadores es 1 por cada 23 (*Capítulo 10*) y la sensibilidad del test de cribado es 0,9, entonces 1 persona de cada 25 será portadora. Dado este pequeño número, comparado con el número inicial de personas cribadas, es posible analizar al compañero con un gran panel de mutaciones para minimizar el número de falsos negativos. Por último, un criterio para un programa de cribado podía ser que el riesgo para una pareja positiva–negativa no debería ser mayor que el riesgo inicial para cualquier pareja antes del cribado. Se podría argumentar que el programa no deja a nadie en peor posición que antes del cribado. Para una frecuencia de portadores de 1 de cada 23, se requiere un 99,8% de sensibilidad para analizar al compañero de un portador conocido (por lo que el riesgo de un

falso negativo es de 1 de cada 500). Las cifras de la *Tabla 11.1* sugieren que alcanzar una sensibilidad del 99,8% sería todo un reto.

Tabla 11.1 – Distribución de las mutaciones de CFTR en 1.754 cromosomas de fibrosis quística analizadas en Manchester, Reino Unido

Mutación	Exón	Nº encontrado	Porcentaje de fibrosis quística	Acumulado %
p.F508del	10	1420	81,0	
p.Gly551Asp	11	62	3,5	84,5
p.Gly542X	11	20	1,1	85,6
c.621+1G>T	Intrón 4	17	1,0	86,6
c.1898+1G>A	Intrón 12	16	0,9	87,5
p.Arg553X	11	13	0,7	88,3
p.Arg117His	4	13	0,7	89,0
p.Arg560Thr	11	11	0,6	89,6
c.3272-26A>G	Intrón 17a	10	0,6	90,2
c.3659delC	19	9	0,5	90,7
p.Asn1303Lys	21	8	0,5	91,2
c.1717-1G>A	Intrón 10	7	0,4	91,6
c.2711delT	14a	7	0,4	92,0
Otras detectadas		114	6,5	98,5
Desconocida		27	1,5	
Total		**1754**		**100,0**

Se podría alcanzar una sensibilidad del 90% analizando las nueve mutaciones más frecuentes; para el 95% de sensibilidad se necesitaría analizar 26 mutaciones.
Datos cortesía del Dr. Martin Schwartz, St. Mary's Hospital, Manchester.

- Hannah, lactante de 6 meses
- Origen judío ashkenazi
- Enfermedad de Tay-Sachs
- ¿Analizar a los hermanos?
- ¿Cribado para la enfermedad de Tay-Sachs?

Entre los judíos ashkenazi la frecuencia de portadores para la enfermedad de Tay-Sachs es 1 de cada 30. Por ello, en Estados Unidos y otros países se establecieron programas de cribado de portadores en la década de los setenta. La *Tabla 11.2* muestra algunas estadísticas. En los países donde la comunidad ashkenazi ha aceptado el cribado de portadores de manera entusiasta, la mayoría de los lactantes afectos nacidos actualmente no pertenecen a parejas judías.

El cribado utiliza un test bioquímico que mide la capacidad de la hexosaminidasa A en suero para hidrolizar el sustrato artificial MUG (una *N*-acetil gluco-

Tabla 11.2 – Cribado de portadores de Tay-Sachs entre los judíos ashkenazi, 1971–1998

País	Número analizado	Portadores	Pareja de portadores
Estados Unidos	925876	35372	795
Israel	302395	7277	380
Canadá	65813	3301	62
Sudáfrica	15138	1582	52
Europa	17725	1127	37
Brasil	1027	72	20
México	655	26	0
Argentina	84	5	0
Australia	3334	102	4
Total	**1332047**	**48864**	**1350**

Datos de Gravel RA *et al.* (2001) y reproducidos aquí con permiso de la Editorial McGraw-Hill.

samina derivada de la 4-metil umbrelliferona). El análisis de ADN no se utiliza para el cribado poblacional porque no todos los portadores tienen una de las mutaciones ashkenazi comunes (ver *Tabla 10.2*). Se requiere un test diagnóstico más definitivo tras un resultado positivo en el cribado. Alrededor del 2% de los judíos y del 35% de los no judíos identificados como portadores por el test de cribado solo portan un alelo pseudodeficiente. Tales alelos codifican para una variante de la enzima que es inactiva frente al sustrato artificial utilizado en el test de cribado, pero conserva suficiente actividad frente al ganglióside G_{M2}, para no ser patogénico. El cribado para la enfermedad de Tay–Sachs normalmente es combinado con el de una selección variable de otras "enfermedades judías" listadas en el *Cuadro de enfermedad* 10.

Hay varias maneras por las que se puede llevar a cabo un programa de cribado y varias acciones que permiten seguir un test con resultado positivo. El problema es elegir cuál adoptar para una determinada comunidad. Cualquiera que sea el protocolo adoptado, el cribado debe ser voluntario y requiere de un consentimiento informado.

- **Analizar lactantes o niños** no es ético y, además, es ineficiente. Los niños no pueden dar un verdadero consentimiento y el resultado no tiene implicación hasta muchos años después, y para entonces bien puede haberlo olvidado.
- **Analizar adolescentes** implica no saber cuándo el consentimiento es realmente voluntario y requiere un manejo cuidadoso para evitar la estigmatización de portadores. Algunas comunidades ortodoxas tratan de solucionar el problema de la estigmatización dando los resultados al casamentero y no a los individuos analizados (ver más abajo).
- **Analizar adultos jóvenes y solteros voluntarios** minimiza los problemas del consentimiento, pero se puede perder una parte del grupo diana.

- **Analizar parejas** identifica al pequeño número de parejas en riesgo sin preocuparse del gran número de portadores cuyo cónyuge no es portador (compara las dos últimas columnas de la *Tabla 11.2*). Pero elimina la posibilidad de elegir no casarse con un portador. En algunas comunidades ortodoxas donde los matrimonios están semiconcertados, el casamentero tiene los resultados del análisis de los jóvenes solteros para algunas enfermedades recesivas, e indicará si el matrimonio propuesto es de riesgo.

11.4. Resumen y ampliación

¿Qué enfermedades deberían ser cribadas?

Técnicamente, las posibilidades del cribado genético parecen casi ilimitadas. En la práctica, sin embargo, la oferta es mucho más limitada. Aparte de la inevitable demora en llevar los nuevos descubrimientos a la práctica, existen cuatro razones técnicas principales por las que el cribado genético no está más extendido (los factores éticos y sociales se tratarán más tarde).

- Si trabaja en los ejercicios de autoevaluación 1-3, verá que el valor predictivo positivo de un test puede ser muy bajo, incluso si se realiza bien en el laboratorio.
- Una variante de ADN puede estar asociada con un riesgo incrementado a padecer una enfermedad, pero puede ser responsable de sólo una pequeña fracción del riesgo total. El **riesgo atribuible a la población** (*Cuadro 11.3*) es una consideración importante en cualquier programa de cribado. Si una variante explica sólo el 5% del riesgo total, ¿cuál es la razón de este cribado? Si ese 5% está concentrado en unos pocos individuos que tienen un riesgo muy elevado, podría ser valioso para ellos conocerlo, pero este es el abordaje para las enfermedades mendelianas, donde los análisis están basados principalmente en la familia. Si la variante es frecuente, lo que quiere decir que el riesgo se extiende a una gran proporción de la población, parece tener poco valor saber que la tienes.
- Es importante considerar no solo el riesgo relativo, sino también el absoluto. Incluso un riesgo relativo alto podría no ser muy preocupante si se traduce en un riesgo absoluto bajo. Un ejemplo es el Factor V Leiden (OMIM 227400). Este es un factor de riesgo auténtico para el troboembolismo venoso, entre pasajeros aéreos de largo recorrido y para usuarios de contraceptivos orales, entre otros. El riesgo relativo entre los usuarios de contraceptivos orales es alto (alrededor de 15), pero el riesgo absoluto es todavía bastante bajo porque los usuarios de contraceptivos orales generalmente son jóvenes y el riesgo de embolia es dependiente de la edad.
- En general, el cribado no tiene ningún sentido a menos que un resultado positivo lleve a alguna acción útil. Esto podría significar cambios en el estilo de vida, medicamentos profilácticos para reducir el riesgo o quizás un incremento de la vigilancia, por ejemplo, cuando el riesgo es de cáncer y el diagnóstico temprano mejora el pronóstico. A veces el diagnóstico genético se realiza simplemente para suministrar a las personas información para planear su futuro, como por ejemplo, en el análisis predictivo de la enfermedad de Huntington.

Cuadro 11.3

Riesgo atribuible a la población

Es la proporción del riesgo total de enfermedad en la población que es atribuible al factor en cuestión. En ocasiones se denomina Fracción Atribuible a la Población. Si la PAR es baja, se pone en duda el valor del cribado del factor.

Si el conjunto del riesgo en la población es *r*, pero una proporción *p* de la población tiene una variante que les lleva a tener un riesgo adicional *R*, en la parte más alta del riesgo general, entonces de PAR para una variante es *pR/r*.

La Oficina de Genómica y Prevención de Enfermedades del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades en Estados Unidos ha proporcionado un marco que puede ser utilizado para evaluar cualquier test genético (u otro), no como un test de cribado.

- **Validez analítica:** ¿Cómo es de precisa la medida del test en lo que que tiene que medir? Para un análisis de ADN esto significa en qué proporción de todas las mutaciones de un gen están recogidas en el protocolo de análisis.
- **Validez clínica:** ¿Qué precisión tiene el test para detectar o predecir la presencia o ausencia de la enfermedad? Por ejemplo, la mayoría de las personas con hemocromatosis hereditaria (OMIM 235200) tienen mutaciones en ambas copias de su gen *HFE*, normalmente p.Cys282Tyr y/o p.His63Asp. Pero analizar estas mutaciones tiene una validez clínica baja debido a que la gran mayoría de los homocigotos y heterocigotos compuestos para las mutaciones no tienen signos clínicos de hemocromatosis.
- **Utilidad clínica:** ¿Son útiles los resultados del test para proporcionar beneficios clínicos? Todas las personas con síndrome de Waardenburg Tipo 1 (OMIM 193500) tienen una mutación en el gen *PAX3*. El test tiene una validez analítica y clínica muy elevada, pero detectar las mutaciones no proporciona beneficios clínicos obvios en la mayoría de los pacientes.
- **Implicaciones éticas, legales y sociales.**

Los programas de cribado basados en la población necesitan ser financiados por el Estado o por compañías de seguros. Los financiadores evaluarán cualquier proyecto críticamente según criterios técnicos, financieros y éticos. Los criterios utilizados se basan en una batería formulada por Wilson y Jungner en un artículo en 1968 para la Organización Mundial de la Salud (ver *Referencias*). El *Cuadro 11.4* muestra una selección de criterios utilizados por el United Kingdom National Screening Committee (Comité Nacional de Cribado del Reino Unido). Las empresas ofrecerán un análisis genético si creen que van a encontrar un mercado rentable para él. Esto ha dado lugar a que varias empresas ofrezcan un test de cribado de "estilo de vida", analizando variantes asociadas a un riesgo incrementado de padecer algunas enfermedades comunes, emparejadas con el consejo de cómo mitigar cualquier riesgo (ver *Cuadro 11.5*). La rentabilidad puede depender de ser capaz de pasar parte del coste a alguien más. Cualquiera en el Reino Unido que obtiene un resultado inquietante en un test de una compañía en internet, probablemente esperará que su médico de familia y el servicio de genética del NHS (Servicio Nacional de Salud) se ocupen de ello.

Cuadro 11.4

Criterios utilizados por el Comité Nacional de Cribado del Reino Unido

Para ver la lista completa de los 22 criterios consulta www.nsc.nhs.uk/pdfs/criteria.pdf.

La enfermedad:

(1) La enfermedad debe ser un importante problema de salud.
(2) La epidemiología y la historia natural de la enfermedad deben ser entendidas adecuadamente...
(3) Todas las intervenciones rentables de prevención primaria deben haber sido puestas en práctica todo lo posible.
(4) Si se identifican portadores de una mutación como resultado de un cribado, la historia natural de las personas con este estatus debe de ser entendida, incluyendo las implicaciones psicológicas.

El test:

(5) Debe ser un test de cribado simple, seguro, preciso y validado.
(7) El test debe ser aceptable para la población.
(9) Si el análisis es para mutaciones, el criterio utilizado para seleccionar un subgrupo de mutaciones para ser incluidas en el cribado, debe ser expuesto claramente si todas las mutaciones no están siendo analizadas.

El tratamiento:

(10) Debe haber un tratamiento o intervención efectiva para los pacientes identificados mediante detección temprana, con la evidencia de que el tratamiento temprano lleva a un mejor resultado que un tratamiento tardío.

El programa de cribado:

(13) Debe haber evidencia de ensayos controlados de alta calidad randomizados en los que el programa de cribado sea efectivo en la reducción de la mortalidad o de la morbilidad. Cuando el cribado está dirigido únicamente a proporcionar información para permitir a la persona que está siendo cribada realizar una "elección informada" (p.ej., síndrome de Down, cribado de portadores de fibrosis quística) debe haber evidencia de ensayos de alta calidad de que el test mide el riesgo con precisión. La información sobre el test y su resultado deben ser fácilmente entendidos por el individuo que está siendo cribado.
(14) Debe haber evidencia de que el programa de cribado completo (test, diagnóstico, procedimiento, tratamiento / intervención) es clínica, social y éticamente aceptable para los profesionales de la salud y para el público.
(15) El beneficio del programa de cribado debe pesar más que el daño físico y psicológico causado por el test, los procedimientos diagnósticos y el tratamiento.
(16) El coste oportuno del programa de cribado (incluyendo análisis, diagnóstico y tratamiento, administración, entrenamiento y garantía de calidad) debe estar económicamente equilibrado en relación con el gasto del cuidado médico en su conjunto.
(19) Todas las demás opciones de manejo de la enfermedad deben haber sido consideradas (p.ej., mejora de tratamiento, proporcionar otros servicios), para asegurar que no se podrían presentar intervenciones más rentables....
(20) La información basada en la evidencia, explicando las consecuencias del análisis, investigación y tratamiento debe ser asequible a los participantes potenciales para ayudarles a hacer una elección informada.
(22) Si el cribado es para una mutación, el programa debe ser aceptable para las personas identificadas como portadores y para otros miembros de la familia.

Cuadro 11.5

Análisis genético de "estilo de vida"

Buscando en internet, puede encontrar fácilmente empresas que ofrecen el genotipado de determinadas variantes comunes de ADN para ayudarle a decidir su estilo de vida más saludable. Todas estas ofertas están basadas en publicaciones de asociación entre polimorfismos comunes de ADN y el riesgo de padecer enfermedades específicas. Es probable que los informes sean de reputados científicos publicados en revistas de prestigio. Aparte de la impresionante lista de referencias bibliográficas, hay varias cuestiones que necesita preguntar.

(a) ¿Ha sido validada la asociación? La proporción de las asociaciones publicadas que son reproducidas en estudios independientes es muy baja; ver *Capítulo 13*.
(b) ¿Ha sido validada en todos los grupos étnicos? Muchos factores de riesgo identificados son específicos de ciertos grupos étnicos.
(c) ¿Cuál es el ratio del riesgo? Esto es, ¿incrementa la variante tu riesgo en 20, 5, 2 o 1,1 veces? ¿Le preocupa que se incremente su riesgo en un 10%? Es importante distinguir entre la significación estadística y el tamaño de un efecto. Una gran investigación puede identificar una gran asociación significativa (esto es, no hay duda de que es real) con un ratio de riesgo bastante trivial. Observe que es bien conocido que los ratios iniciales de riesgo casi siempre bajan es estudios posteriores, incluso cuando el riesgo está confirmado.
(d) ¿Cuál es el riesgo atribuible a la población?

Asumiendo que el test es satisfactorio para todos estos criterios, la pregunta que queda es ¿y qué? Las empresas miran las oportunidades del mercado y están menos preocupadas, pero ninguna empresa podría arriesgarse a decir a las personas declaradas como de bajo riesgo en sus tests que pueden llevar una vida insana. Los abogados se pondrían las botas cuando alguien sucumbiera a una enfermedad para la que había sido identificado de bajo riesgo. El riesgo nunca es cero, sino simplemente más bajo que para otras personas. Por lo tanto, a pesar del resultado del test, el consejo de la empresa debe ser la misma rutina de vida sana, más enfatizada para las personas de alto riesgo. Podría entonces argumentarse que semejante análisis no tiene implicaciones éticas. El mismo consejo puede ser válido para todo el mundo sin coste, pero algunas personas solo lo tendrán en cuenta si han pagado 250 $ y tienen un trozo de papel con apariencia científica. La cuestión de salud pública es cuál es el equilibrio entre aquellos que estarían motivados a actuar apropiadamente al recibir un consejo de alto riesgo y aquellos que actuarían de forma inadecuada al recibir un consejo de bajo riesgo.

Una cuestión científica distinta es la relación del resultado del test con el conjunto de la salud, más que con el riesgo de una enfermedad específica. Todos estos análisis están basados en investigaciones que comparan la frecuencia de ciertas variantes de ADN en una cohorte de personas con una enfermedad particular, con la frecuencia en controles que no padecen esa enfermedad. Una variante puede incrementar el riesgo de esta enfermedad, pero quizá compensa reduciendo el riesgo de otra enfermedad. Todo el metabolismo está en equilibrio, optimizado a través de miles de generaciones para a hacer frente a una variedad de circunstancias. Este equilibrio implica compromisos. Una variante que modifica el equilibrio puede cambiar el resultado. Las variantes comunes en la población no pueden ser totalmente desfavorables, o la selección natural las habría eliminado. Por supuesto, es posible que una variante pudiera producir beneficios solo en el ambiente cavernícola y sea desfavorable en sociedades occidentales emergentes, como sugería la teoría del "genotipo económico" de la susceptibilidad a la diabetes (Hales y Barker, 2001). Pero en la actualidad no tenemos casi información de los efectos de las variantes sobre la salud en su conjunto. Esto es relevante en lo que concierne a las compañías de seguros, que podrían querer utilizar los datos de las variantes comunes de ADN en sus pólizas, pero esto también pone una nota de prudencia sobre el valor del análisis genético como una guía de vida sana.

El cribado de recién nacidos es el menos discutido éticamente de los cribados poblacionales, porque las dianas son enfermedades tratables y el propósito es asegurar el tratamiento temprano para evitar daños irreversibles. El Colegio Americano de Genética Médica ha recomendado que todos los recién nacidos sean cribados para 29 enfermedades (*Tabla 11.3*), lo cual ha sido ampliamente aceptado. Aunque su implantación varía inevitablemente de un Estado a otro, en 2006 cerca de dos tercios de los recién nacidos de Estados Unidos habrán sido cribados para al menos 20 enfermedades; casi el doble que el año anterior. La *Figura 11.6* muestra la distribución de la actividad por estados. En la mayoría de los demás países el cribado de recién nacidos está limitado a una corta lista, principalmente por razones económicas.

Las actitudes con respecto al cribado prenatal, de niños o adultos para el reconocimiento de portadores o para el riesgo de desarrollar enfermedades de comienzo tardío, están más enraizadas en culturas locales. Los criterios 7, 14, 15, 20 y 22 de la UK NSC cubren las cuestiones éticas y sociales. El cribado es una expresión de los deseos y valores de la sociedad en la que tiene lugar. El cribado prenatal no tendrá lugar en una sociedad donde el aborto es inaceptable bajo ninguna circunstancia, aunque los dos no estén necesariamente ligados. En al-

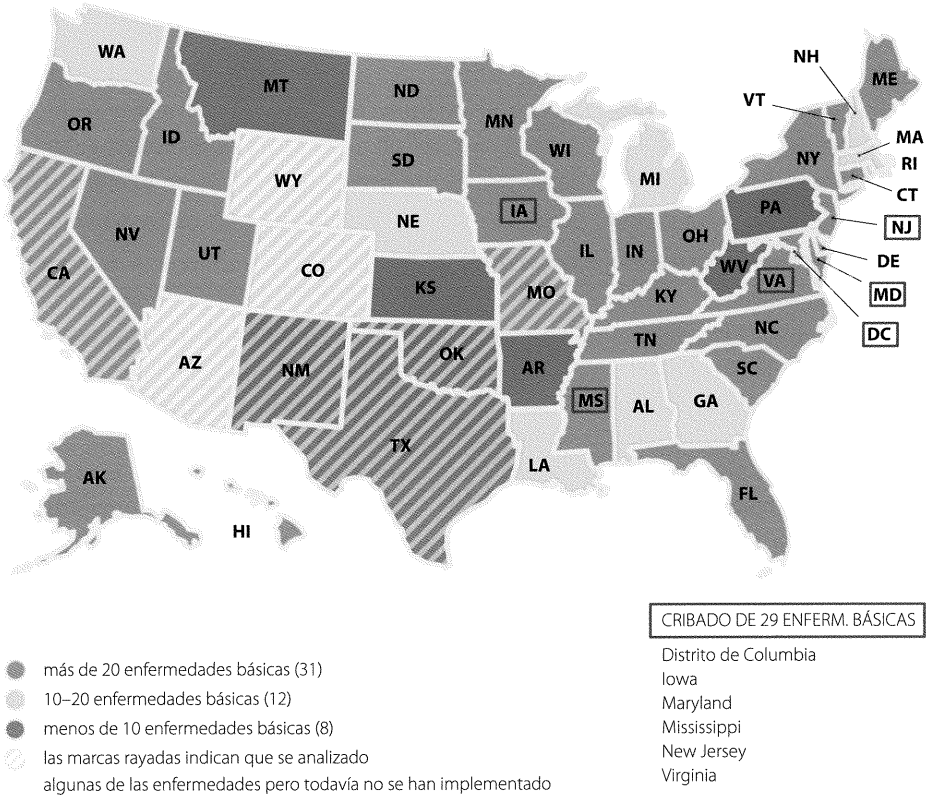


Figura 11.6 – Estado de implantación de las recomendaciones del Colegio Americano de Genética Médica en el cribado de recién nacidos en junio de 2006. Datos procedentes de la March of Dimes Birth Defects Foundation y reproducidos aquí con permiso.

Tabla 11.3 – Las 29 enfermedades para las cuales el American College of Medical Genetics (2005) recomienda que todos los lactantes recién nacidos sean cribados

Enfermedad	Número OMIM	Tratamiento
Deficiencia de la cadena media de la acil-CoA deshidrogenasa	201450	Suplementos nutricionales; evitar el ayuno
Hipotiroidismo congénito	**	Hormona tiroidea oral
Fenilcetonuria	261600	Dieta baja en fenilalanina
Deficiencia de biotinidasa	253260	Biotina oral diaria
Anemia falciforme	603903	Vigilancia médica; evitar infecciones
Hiperplasia adrenal congénita	201910	Cirugía genital; reposición hormonal
Acidemia isovalérica	243500	Dieta baja en proteínas; suplementos nutricionales
Deficiencia de la cadena larga de la acil-CoA deshidrogenasa	201475	Dieta baja en grasas y rica en carbohidratos; suplementos nutricionales; evitar ayunos
Enfermedad del jarabe de arce	248600	Dieta baja en proteínas
Galactosemia	230400	Evitar la leche y los productos lácteos
HbS/β talasemia	141900	Como la anemia falciforme
Enfermedad HbS/C	141900	Como la anemia falciforme
Deficiencia de la cadena larga de la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	609016	Dieta baja en grasas y rica en carbohidratos; suplementos; evitar ayunos
Acidemia glutárica Tipo I	231670	Dieta baja en proteínas con carnitina oral
Aciduria hidroximetilglutárica	246450	Dieta rica en carbohidratos, baja en grasas y proteínas; evitar ayunos
Deficiencia de proteína trifuncional	609015	Dieta baja en grasas; suplementos; evitar ayunos
Deficiencia múltiple de carboxilasa	253270	Biotina oral
Acidemia metilmalónica (deficiencia de mutasa)	251000	Vitamina B_{12} y otros suplementos; dieta baja en proteínas
Homocistinuria	236200	Dieta, suplementos que incluyen vitaminas B_6 y B_{12}
Deficiencia de la 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa 1	210200	Dieta baja en proteínas
Pérdida de audición	**	Estrategia de comunicación; ayuda para oír, quizás un implante coclear
Acidemia metilmalónica (deficiencia cblA o cblB)	251100	Vitamina B_{12}, dieta baja en proteínas
Acidemia propiónica	606054	Dieta baja en proteínas, suplementos
Deficiencia de carnitina-acilcarnitina translocasa	212138	Carnitina
Deficiencia de β-keto tiolasa	203750	Vigilancia médica, dieta baja en proteínas
Citrulinemia	215700	Dieta baja en proteínas, suplementos
Aciduria argininosuccinica	207900	Dieta baja en proteínas, suplementos
Tirosinemia Tipo I	276700	NTBC (ver *Sección 14.4*)
Fibrosis quística	219700	Vigilancia médica

Están enumeradas por orden de prioridad, basado en la frecuencia, gravedad, efectividad del tratamiento y aspecto práctico del cribado. Algunas enfermedades raras se sitúan en posiciones altas del listado porque pueden ser añadidas en una espectrometría de masas multiplex en tándem o en una cromatografía líquida de alto rendimiento, por un pequeño coste extra.**El hipotiroidismo congénito y la pérdida de audición tienen múltiples causas, no todas genéticas.

gunas sociedades las personas anormales son más aceptadas, o son más fatalistas frente a las anomalías, mientras que en otras el deseo por un niño normal es muy fuerte. La responsabilidad individual y los valores relativos de libertad individual y salud pública afectarán a la aceptabilidad de programas específicos. Las actitudes frente a los niños son importantes. ¿Hasta dónde los padres que tienen hijos, tienen derecho a conocer su composición genética, o hasta dónde tiene que ser respetada su autonomía y no realizar análisis hasta que los niños no sean lo bastante mayores como para dar un verdadero consentimiento informado? Este es un principio general; el cribado debe ser voluntario y necesita un consentimiento informado, pero incluso esta cuestión no está bien definida. Un lactante no puede dar su consentimiento para ser cribado para la PKU. Si los padres se oponen, ¿tienen derecho de condenar a su hijo a vivir en una institución especial, mientras esperan que la población general asuma el coste? Sin embargo, las personas, en general, deben ser libres para no someterse al cribado si así lo desean. Esto no solo significa que pueden declinar el análisis; también, que si tras rechazar el análisis prenatal tienen un niño afecto, no deberían ser culpados o penalizados en modo alguno.

En Inglaterra, la comunidad griega chipriota ha aceptado el cribado para la β-talasemia con entusiasmo, mientras que la comunidad paquistaní, de alto riesgo también, en su mayoría no lo desea. En Israel hay una fuerte demanda popular para todos los tests de cribado posibles, mientras que en Reino Unido esta es más prudente. Por ejemplo, una cadena de grandes almacenes británica dejó de ofrecer un grupo de tests de "estilo de vida" tras la preocupación por las consecuencias, aunque muchos mantenían que estos tests no eran más dañinos que el horóscopo, y en el peor de los casos, solo suponían un gasto de dinero. Según las tiendas, la razón para suspender la oferta era la pérdida de interés del público.

En cuanto a la economía del cribado, es interesante ver cómo el criterio 16 de la lista UK NSC está redactado con bastante cautela. Calcular los beneficios financieros de un programa de cribado normalmente implica equilibrar los costes inmediatos del cribado frente a las demandas económicas a largo plazo. Esta es un área difícil, aunque por supuesto vital en muchas áreas de las pólizas. Se maneja utilizando descuentos. Para comparar el coste actual con la economía en 10 años, el coste presente se trata como una inversión, cuyo valor en 10 años se calcula utilizando interés compuesto. El tipo de interés utilizado (el descuento) obviamente afecta al resultado, pero diferentes tipos de institución pueden tener diferentes puntos de vista sobre la relevancia de la economía potencial en el futuro lejano. Por otra parte, estos cálculos tienen sus limitaciones como guías de acción. Aplicado a la paternidad normal, el método de descuento sugiere que la reproducción es desastrosa financieramente para la sociedad: es muy improbable que una contribución individual a la sociedad en impuestos como trabajador adulto pueda devolver los costes de su parto y de su educación.

Si los cálculos del coste parecen razonables, la decisión de realizar un programa de cribado gira entorno a la demanda pública y a la aceptabilidad social. Como la opinión pública nunca es unánime en estos temas, las decisiones al final son políticas.

Hipercolesterolemia familiar

Todos tenemos algún familiar con un nivel elevado de colesterol, signo de una dieta insana, pero alrededor de 1 persona de cada 500 tiene un nivel extremadamente elevado de colesterol, resultado de una enfermedad genética, independientemente de su dieta. La hipercolesterolemia familiar (FH; OMIM 143890) es una enfermedad autosómica dominante. En muchas poblaciones es la más común de las enfermedades mendelianas. Los heterocigotos tienen niveles de colesterol en suero y de colesterol LDL de 250–450 y 200–400 mg/dl (rango normal 150–250 y 75–175 mg/dl). Desarrollan xantomas tendinosos (depósitos subcutáneos de colesterol) y sufren enfermedades de las arterias coronarias en la mitad de su vida, con muchas muertes prematuras por infarto de miocardio. Los homocigotos afectos son raros y tienen todas estas características, pero en grado extremo.



(a) (b) (c)

Depósitos de colesterol en pacientes heterocigotos de hipercolesterolemia familiar. (a, b) Xantomas tendinosos y (c) arco corneal. Fotos cortesía del Dr. Paul Durrington, Manchester Royal Infirmary.

Michael Brown y Joseph Goldstein ganaron en 1985 el Premio Nobel de Medicina por su trabajo en FH que ha llevado a un detallado entendimiento de la homeostasis del colesterol (ver *Referencias* para ampliar información). Demostraron que la FH normalmente está causada por mutaciones en el gen del receptor de la lipoproteína de baja densidad (*LDLR*). Este receptor de superficie importa el colesterol que contiene LDL hacia el interior de las células del hígado (un ejemplo de endocitosis mediada por receptor), donde reprime la síntesis de colesterol endógeno como parte de un mecanismo homeostático. El receptor mutado está ausente o falla al unir el LDL, dependiendo de la mutación, dando lugar a una producción incontrolada de colesterol endógeno. A veces la FH puede ser producida por mutaciones en uno de estos otros dos genes:

- Algunas personas producen LDL que no es reconocido por el receptor de LDL, porque un gen mutante *APOB* codifica una forma anormal de la lipoproteína.
- Otras tienen una ganancia de función en mutaciones de pérdida de sentido en *PCSK9*, gen que codifica una enzima procesadora de proteínas que es parte del mecanismo homeostático.

La acción normal de internalizar el LDL es reprimir la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG CoA) reductasa, que cataliza el paso limitante en la síntesis del colesterol. En los pacientes FH, las estatinas se utilizan para inhibir la enzima. Este es un manejo clínico muy efectivo, que puede normalizar los niveles de colesterol y los riesgos de la salud. Ya que la enfermedad es frecuente, tiene serias implicaciones de salud y puede ser tratada efectivamente, es un buen caso para cribar a toda la población para la FH. Sin embargo, las consecuencias son considerables. El cribado basado en los niveles de colesterol y los xantomas tiene una sensibilidad muy pobre, especialmente en la gente joven. El cribado basado en el ADN es caro porque el gen *LDLR* en el cromosoma 19p13.2 tiene 18 exones y se han descrito varios cientos de mutaciones diferentes.

Dado que esta enfermedad dominante afecta a familias muy grandes, un método rentable para averiguar un gran número de personas afectas es analizar parientes de casos afectos conocidos, un procedimiento conocido como **cribado en cascada** o análisis en cascada. El principio fue mencionado anteriormente en relación con el análisis de parientes de **Joanne Brown (Caso 2)** para las mutaciones de fibrosis quística. El mejor programa de cribado en cascada para FH desarrollado,

Cuadro de enfermedad 11 - *Continuación*

en los Países Bajos, fue puesto en marcha en 1994. Los parientes son contactados directamente por un trabajador de campo de la genética. Delimitar y rastrear a la familia es excepcionalmente minucioso, dando lugar a un promedio de 25,7 parientes por probandus. De los que resultan afectos, solo el 39% ya están tratados con estatinas. Véase Hadfield y Humphries (2005).

Los estudios del programa holandés han demostrado claros beneficios clínicos: el 93% de las personas afectas encontradas a través del programa tomaron estatinas posteriormente. Se pueden plantear varias cuestiones éticas. El contacto directo con los parientes se considera problemático éticamente en algunos países, por lo que se les invita a los probandus a que sugieran a sus parientes que pueden beneficiarse al hablar con un genetista. Esto evita algunos problemas, pero disminuye mucho el número de parientes analizados por probandus. Hay problemas sobre la identificación de niños afectos: ¿el beneficio de un tratamiento temprano pesa más que el riesgo de estigmatización o el perjuicio en su autoestima? También es necesario pensar en las consecuencias en cuanto a los seguros para las personas contactadas inesperadamente. Algunas compañías, al menos, han aceptado el argumento de que la suscripción debe estar basada en el fenotipo (el nivel de colesterol actual en el paciente tratado, y no en el genotipo. Ya que el tratamiento con estatinas es efectivo, predispone en gran parte las pólizas de seguros. Estudios cuidadosos del programa holandés no han mostrado ninguno de los efectos adversos pronosticados, aunque es posible que en parte refleje las cualidades admirables de la sociedad holandesa.

11.5. **Referencias**

Conde-Agudelo A y Kafury-Goeta AC (1990) Triple marker test as screening for Down syndrome: a meta-analysis. *Obstet. Gynecol. Survey* 53: 369–376.

Hadfield SG y Humphries SE (2005) Implementation of cascade testing for the detection of familial hypercholesterolaemia. *Curr. Opin. Lipidol.* 16: 428–433.

Hales CN y Barker DJP (2001) The thrifty phenotype hypothesis. Type 2 diabetes. *Br. Med. Bull.* 60: 5–20.

Ogilvie CM, Lashwood A, Chitty L, Waters J, Scriven PN y Flinter F (2005) The future of prenatal diagnosis: rapid testing or full karyotype? An audit of chromosome abnormalities and pregnancy outcomes for women referred for Down syndrome testing. *Br. J. Obstet. Gynae.* 112: 1369–1375.

Wilson JMG y Jungner G (1968) *Principles and Practice of Screening for Disease.* World Health Organization, Geneva.

Páginas web útiles

La página web de la UK National Electronic Library tiene una buena sección de cribado: http://www.library.nhs.uk/screening/.

Mire también la del UK Newborn Screening Programme Centre: http://www.newbornscreening-bloodspot.org.uk/.

Un ejemplo de servicio de cribado prenatal (uno de tantos, pero con buena documentación para el síndrome de Down y la fibrosis quística) es el UK Leeds Antenatal Screening Service: http://www.leeds.ac.uk/lass/Index.htm.

La página web del laboratorio de Brown-Goldstein en el UT Southwestern Medical Center cuenta una historia fascinante sobre la regulación del colesterol: http://www4.utsouthwestern.edu/moleculargenetics/pages/brown/past.html

11.6. Ejercicios de autoevaluación

(1) Una enfermedad hipotética está causada por mutaciones en el gen *IGNO*. Es portadora de una mutación 1 persona de cada 100. Tiene un protocolo de análisis genético que detecta el 80% del total de las mutaciones. Recibe 10.000 muestras de sangre de niños recién nacidos, pero el 1% de ellas se tomaron en tubos contaminados que dan como resultado falsos positivos en el test. ¿Cuál es el valor predictivo positivo de tu test?

(2) Un científico ha estado estudiando personas que sufren efectos adversos graves de un determinado medicamento. En la población general, 1 persona de cada 10.000 sufre estos efectos. Ha identificado un polimorfismo de ADN que está muy asociado con el riesgo. En un análisis ciego en el laboratorio, 99/100 de las personas que han mostrado reacciones adversas al medicamento tienen la variante, mientras que solo el 1/100 de quienes han tomado el medicamento sin efectos nocivos han sido positivas para el análisis. Propone cribar al millón de población de esta ciudad para la variante. Calcular el valor predictivo positivo de este test.

(3) Repita el cálculo de la pregunta anterior, asumiendo la reacción adversa ocurrida en 1 persona de cada 10 en vez de en 1 de cada 10.000. ¿Qué nos dice esto sobre el potencial cribado general?

(4) Asumiendo una incidencia de defectos de tubo neural de 1:100 embarazos analizados, utilizar las curvas de la *Figura 11.2* para estimar la sensibilidad y el valor predictivo positivo del test MSAFP, con los puntos de corte:

(a) Todo el mundo está por encima del valor de la media normal.
(b) Todo el mundo está por encima del valor mínimo anormal.
(c) Todo el mundo está por encima del valor máximo normal.

(5) En el cribado de los portadores de la fibrosis quística, algunas parejas podrán tener un miembro con un test positivo y otro negativo. Calcular la sensibilidad requerida en un test de cribado para asegurar que no tienen mayor riesgo de ser ambos portadores del que tenían antes de hacer el cribado. Asumir que la frecuencia de portadores es de 1 por cada 40.

(6) Es un técnico de la salud encargado de realizar un programa de cribado para portadores de fibrosis quística (1 persona de cada 25 en su población).

(a) Decida en qué etapa de su vida y bajo qué circunstancias las personas deben ser analizadas; escriba una justificación breve de su elección.
(b) Tiene propuestas de dos compañías para desarrollar el genotipado. Una ofrece al test un limitado panel de mutaciones, que cubren el 70% de todas las mutaciones; el otro test un gran panel que cubre el 90%. El coste es diferente, pero antes de tomar decisiones necesita conocer los resultados probables. Para cada opción, calcule el resultado esperado para un cribado de un millón de personas, en términos de nacimientos evitados con fibrosis quística y nacimientos con fibrosis quística, en parejas en las que ambos no son portadores en el test de cribado.

Capítulo **12**

¿El cáncer es genético?

Conceptos y habilidades que aprenderá en este capítulo:

Después de estudiar este capítulo será capaz de:

- Describir la carcinogénesis como un proceso evolutivo en un individuo.
- Definir los oncogenes y los genes supresores de tumores, dando ejemplos.
- Definir los tipos de inestabilidad cromosómica encontradas en las células cancerígenas y el papel de los puntos del control del ciclo celular para evitarlo.
- Enumerar las capacidades de los tumores malignos y describir los tipos de cambios genéticos somáticos que dirigen su desarrollo, incluyendo la activación de oncogenes o inactivación de genes supresores de tumores por mutación somática, cambios epigenéticos, deleciones que producen pérdida de heterocigosidad y reordenamientos cromosómicos fusión de genes.
- Describir al menos tres síndromes de cáncer hereditarios y discutir su relación con cánceres esporádicos comunes.
- Describir el papel de la genética en el diagnóstico, tratamiento y prevención del cáncer.

12.1. **Historias clínicas**

CASO 23 | Familia Wilson | **293** | 311 | 376

- ? Cáncer de mama familiar

Wendy Wilson vio en la televisión un programa acerca del cáncer de mama acumulado en familias lo que le llevó a preocuparse de su propia historia familiar. Ella ya había mencionado sus preocupaciones unos años antes al médico de la familia, pero la tranquilizó. Su madre, Wanda, había desarrollado la enfermedad a los 42 años y murió dos años después. La hermana de su madre, Amy, que vivía en Nueva Zelanda, también desarrolló cáncer de mama a sus 40, pero después de la cirugía y la quimioterapia estuvo bien después de 7 años. Las Navidades previas, Wendy había recibido una carta de su tía mayor en la que se mencionaba que uno de sus nietos estaba en tratamiento por cáncer de mama, y expresaba su shock por que un hombre pudiera estar afectado. Wendy se reunió con su hermano William y su hermana Verónica, y decidieron que deberían estudiar las cosas con más detalle. Verónica era la genealogista de la familia y antes estuvo en contacto con muchos familiares con los que había perdido relación. Encontraron que una prima de Wanda había muerto a una edad temprana por cáncer de mama. El programa de televisión había mencionado que había pruebas disponibles para familias con cáncer de mama a través de las clínicas genéticas. Wendy se citó con el médico de fa-

milia para pedirle que la remitiera al especialista. Wendy dio tantos detalles como pudo al cirujano y este consultó los protocolos *online* proporcionados por el centro de genética. La familia de Wendy cumple los criterios de alto riesgo y se hizo la interconsulta. Antes de la cita, el consejero genético del centro contactó con Wendy para dibujar el árbol genealógico. También preguntó a Wendy por detalles de su madre y dónde fue tratada para conseguir la historia médica y confirmar los detalles de su enfermedad.

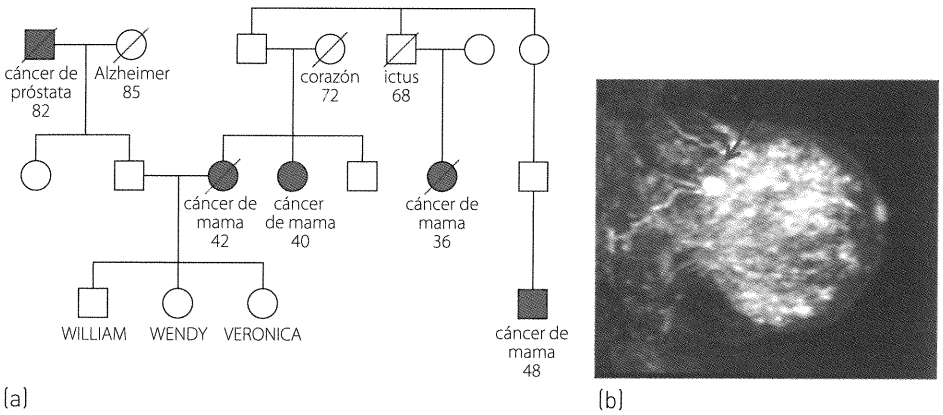


Figura 12.1 – (a) Árbol genealógico de la familia Wilson con los tipos de cáncer y edad en el diagnóstico. (b) Carcinoma de mama detectado en una mujer a los 40 años de edad, imagen por resonancia magnética. La mujer tenía la mutación *BRCA 1*. Foto cortesía de Dr. Gareth Evans, St Mary's Hospital, Manchester.

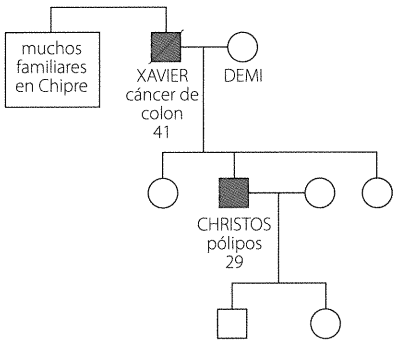
CASO 24 Familia Xenakis **294** 315 376

- Historia familiar de problemas intestinales
- ? FAP

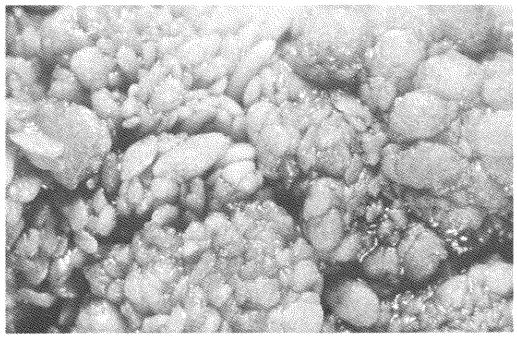
Christos es uno de los tres hijos de Xavier y Demi Xenakis nacidos en Chipre en 1960. Xavier empezó a tener síntomas intestinales a la edad de 41 años, pero no fue a ver al doctor hasta que no estuvo realmente mal. En el hospital, fue diagnosticado de cáncer de intestino con metástasis en hígado y solo fue posible un tratamiento paliativo. Un año después murió y, más tarde, Christos se trasladó a Seattle para abrir su propio restaurante con su mujer y sus hijos. Demi fue a vivir con ellos. Tenían una vida muy ocupada, pero el restaurante iba bien. Varios años después, en el reconocimiento médico de una aseguradora, Christos mencionó que había tenido recientemente alguna hemorragia rectal que pensaba que podía ser debida a hemorroides. Teniendo en cuenta la historia familiar, el médico le recomendó hacerse una sigmoidoscopia que reveló múltiples pólipos.

El cirujano les explicó que esto indicaba que Christos tenía una poliposis adenomatosa familiar y que el único tratamiento eficaz era extirpar el colon, ya que era inevitable que uno o más pólipos desarrollaran un cáncer. Mientras Christos estaba todavía en el hospital, el cirujano les recomendó acudir a una clínica genética para averiguar los riesgos para sus hijos, y realizar los tests de *screening* que deberían hacerse. Después de unos meses la familia fue atendida en una clínica genética. El consejero les explicó que había una herencia dominante, y concluyeron que cada uno de los niños tiene un riesgo del 50% de haber heredado el gen mutante. Supieron que sería posible hacer un test genético si se encontraba una mutación en Christos y que, a los hijos que estuvieran en riesgo o en los

que se viera que eran portadores de la mutación, se les ofrecería la realización de sigmoidoscopias periódicas desde los 10 años de edad.



(a)



(b)

Figura 12.2 – Poliposis adenomatosa familiar del colon.
(a) Árbol de la familia Xenakis. (b) Parte del colon resecado quirúrgicamente con pólipos. Foto cortesía de Medical Illustration Departmento, Manchester Royal Infirmary.

12.2. **Antecedentes**

Selección natural y evolución del cáncer

Imaginemos un bosque aislado en el que vive una población de ratones de campo. Un ratón adquiere una mutación heredable que la hace capaz de reproducirse más rápidamente que los otros ratones. Si visitara el bosque 100 generaciones de ratones después, esperaría encontrar que la mayoría de los ratones fueran descendientes de los mutantes de reproducción rápida. El mismo argumento darwiniano se puede aplicar exactamente a las células de su cuerpo. La división celular está bajo control genético. Si una adquiere una mutación que hace que se divida más rápido que las otras, si todo sigue igual, sus descendientes tomarán posesión de su cuerpo. Por lo tanto, el cáncer no es una enfermedad específica con una causa y una cura esperando a ser descubierta. Si todo sigue igual, simplemente es el punto final natural de la evolución dentro del cuerpo de cualquier organismo multicelular.

Afortunadamente, todas las cosas no son iguales. Los organismos multicelulares no podrían sobrevivir sin los mecanismos de control y represión de sus células somáticas, al menos hasta que su vida reproductiva se haya sobrepasado. Tras billones de años de evolución, los organismos multicelulares han desarrollado defensas sofisticadas y con muchos niveles contra las células inapropiadas. El crecimiento celular está estrechamente controlado. La mayoría de las células somáticas no tienen la capacidad de dividirse indefinidamente. Algunas células que se comportan inapropiadamente y tienen un comportamiento antisocial remedio son obligadas a "suicidarse" **(apoptosis)**. Hanahan y Weinberg (2000) enumeran seis capacidades funcionales que un tumor maligno necesita adquirir para desarrollarse y sobrevivir (*Cuadro 12.1*). Adquirir cada capacidad significa superar un mecanismo regulador independiente o una línea de defensa en el organismo. En consonancia con esto, estudios clásicos de incidencia de cánceres epiteliales comunes dependientes de la edad sugieren que serían necesarios de cuatro a siete sucesos independientes para generar un tumor maligno.

Cuadro 12.1

Las seis capacidades esenciales de un tumor maligno

De acuerdo con Hanahan y Weinberg (2000), un tumor maligno necesita adquirir las siguientes seis capacidades durante su desarrollo:

- Habilidad de las células para dividirse con independencia de las señales de crecimiento.
- Habilidad de la células para ignorar las señales anticrecimiento externas.
- Habilidad de las células para evitar la apoptosis.
- Habilidad de las células para dividirse indefinidamente sin senescencia.
- Habilidad para estimular angiogénesis continuamente.
- Habilidad para invadir tejidos y establecer tumores secundarios a distancia.

Los tumores contienen diversidad de células y estas capacidades probablemente pertenecen a sólo una población de células madre cancerosas. Adquirir cada capacidad es semejante a requerir cambios específicos genéticos o epigenéticos para burlar los mecanismos de regulación. Posibles excepciones son la habilidad de dividirse indefinidamente, si la célula fundadora era ya una célula madre, y la capacidad de metastatizar; es controvertido saber con qué frecuencia se adquiere esta capacidad específica y con cuál, las otras cinco capacidades.

Vencer las defensas

Considerando la tasa de mutación típica, la oportunidad de que una célula en el cuerpo de una persona consecutivamente adquiera seis mutaciones específicas podría ser extremadamente baja. Asumiendo una tasa de mutación por gen por célula de 10^{-6}, la probabilidad de que una célula sufra seis mutaciones específicas sucesivas es de 10^{-36}. Solo hay del orden de 10^{14} células en el cuerpo humano, por tanto, parecería que las defensas contra el cáncer son inexpugnables. Debe de haber algún modo de sortear las defensas.

El truco está en que la mutación más temprana en el proceso debe aumentar la probabilidad de las mutaciones posteriores. Esto puede ocurrir de dos maneras.

- Pueden conferir a la célula una ventaja de crecimiento. Si la célula mutante puede generar 1000 células mutantes hijas, la probabilidad de que una célula mutada adquiera la siguiente mutación ha aumentado 1000 veces. Los patólogos saben desde hace tiempo que los tumores se desarrollan a través de estadios que están marcados por el aumento del potencial de crecimiento. Se cree que las células fundadoras de muchos tumores tienen propiedades similares a las células madre; por ello tienen un inusual potencial de crecimiento (Pardal *et al.*, 2003).
- Pueden aumentar la tasa general de mutaciones por desestabilización del genoma. Todas las célula cancerosas muestran uno o dos tipos de inestabilidad genómica:
  (I) **Inestabilidad cromosómica:** la mayoría de las células de un tumor tienen cariotipos extraños con un número anormal de cromosomas y muchos reordenamientos estructurales (*Cuadro 12.2*);
  (II) **Inestabilidad de microsatélites:** unos pocos tumores son cromosómicamente normales, pero los tests de ADN muestran que los controles normales de la replicación cuidadosa del ADN se han perdido.

El resultado de estos cambios es que los primeros estadios de la tumorigénesis son propensos a producir una población creciente de células con una gran variedad de mutaciones al azar, siendo un terreno fértil para el siguiente paso. Los genes que empiezan a mutar en estos primeros estadios se clasifican en **oncogenes** y **genes supresores de tumores.** La clasificación depende del tipo de mutación requerida (ganancia de función o pérdida de función), pero esto a su vez depende de la función normal del gen. En sentido amplio, los oncogenes son genes cuya función normal es la de estimular la división celular, mientras que el papel normal del gen supresor de tumores es frenar la división celular.

Cuadro 12.2

Inestabilidad cromosómica en células cancerosas

Las células cancerosas tienen muchos cariotipos anormales con numerosas ganancias, pérdidas y reordenamientos. Las células de los tumores sólidos normalmente proporcionan malas preparaciones de cromosomas que son difíciles o imposibles de analizar mediante técnicas convencionales de citogenética. El M-FISH o el SKY son diferentes técnicas de pintado cromosómico multicolor (ver *Sección 4.4*) que hacen que cada cromosoma original aparezca con un color diferente. Estos métodos permiten analizar detalladamente los cambios citogenéticos en células cancerígenas. A modo de ejemplo, este es el cariotipo de una línea celular de un carcinoma de colon humano HT29 recogido por Dr T Reid:

67–71,XX,del(X)(p11.2)[19], del(3)(p21)[11], der(3)ins(3;12)(p12;?)[16], der(3)del(3)(p25) ins(3;12)(p12;?)[5], der(3)t(X;3)(?;qter)[11], i(3)(q10)[21], del(4)(q31.3) [21], +der(5)t(5;6)(q11;?)[10], del(6)(q12)[9], t(6;14)(q21;q13)[15], der(6)t(6;14)(q21;q13)[5], +del(7)(p15)[17], –8[20], der(8)i(8)(qter->q10::q10->q24::hsr::q24->qter)[21], +11[20], –13[9], der(13)i(13)(q10)del(q14)[11], der(13)t(5;13)(p13;p11.1)[12], i(13)(q10)[18], –14[21], –14[4],+15[20], der(17)t(17;19)(p11;p11)[21], i(18)(p10)[19], –19[13], i(19)(q10)dup(19)(q13.1q13.4)[19], +i(20)(q10)[21], –21[21], der(?22)t(17;?22;17)[20]

Se analizaron 21 células. El número de cromosomas varió entre 67 y 71. El número en corchetes es el número de células que tienen esa anomalía específica. Este y muchos otros casos pueden verse como un "Skygram" en la web del Nacional Cancer Institute: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sky/

Vivir para siempre: la importancia de los telómeros

Las células cancerígenas son inmortales: han adquirido la capacidad número 4 del *Cuadro 12.1.* Las células HeLa, una línea de cultivo de células estándar de laboratorio, lleva más de medio siglo creciendo. Las células humanas ordinarias no hacen esto. Crecen en cultivos unas pocas docenas de veces, pero paran de crecer; es una característica llamada senescencia. Las células con ciertas mutaciones relacionadas con el cáncer (en *TP53* y *RB1*, ver a continuación) evitan la senescencia. Después de muchas divisiones alcanzan un estado llamado crisis. La crisis está marcada por la muerte de la gran mayoría de las células. Las pocas supervivientes han adquirido numerosos reordenamientos cromosómicos y la inmortalidad de las células cancerosas.

Estos acontecimientos están relacionados con un problema en la replicación del final de los cromosomas. Recordemos que las dos fibras de la doble hélice son antiparalelas, y que la fibra de ADN sólo puede crecer en la dirección 5′→3′

(*Cuadro 3.2*). Una cadena de la doble hélice tiene libre el extremo 5'. Cuando esta cadena se emplea como modelo para la síntesis de una cadena complementaria, la polimerasa se mueve hacia el final de la cadena y no hay problema en extender la nueva cadena hasta el final (*Figura 12.3a*). La otra, con el final 3' libre, tiene problemas. Cuando esta cadena se emplea como modelo, la polimerasa se mueve en la dirección desde el final hacia al interior del modelo, en contra de la dirección del movimiento de la horquilla de reaplicación. Esta nueva cadena se hace discontinuamente en segmentos de 100-200 nt (**fragmentos de Okazaki**). Cada fragmento empieza con un cebador pequeño (10 nt) de ARN. El último cebador no empieza en el último nucleótido del cromosoma y, si lo hiciera, los 10 nt correspondientes al primero se perderían, ya que el cebador es eliminado cuando todos los fragmentos de Okazaki se unen. Así, el ADN de doble hélice lineal pierde alguna secuencia del final cada vez que es replicado.

Las bacterias resuelven este problema al tener cromosomas circulares; las células eucariotas usan los telómeros. Los cromosomas humanos acaban con 10Kb de secuencias repetitivas (TTAGGG). Con cada ciclo de división celular el telómero se recorta en 50-100 nt. Dentro de unos límites no es un problema, ya que las repeticiones teloméricas no contienen información genética. Las divisiones repetidas conducirán a una pérdida completa de los telómeros. Una de las funciones de los telómeros es proteger el final de los cromosomas contra los mecanismos de reparación del ADN que reconocerían el final como ADN roto e intentarían unirlos (*Figura 12.3b*). Esto es lo que pasa en las células en crisis post-senescencia.

Cada una de las células de nuestro cuerpo es la descendiente del huevo original fertilizado tras una cadena de divisiones celulares, que a su vez desciende tras una cadena de divisiones de los cigotos que produjeron nuestros padres, y siguiendo una cadena de divisiones celulares continuas a través de generaciones

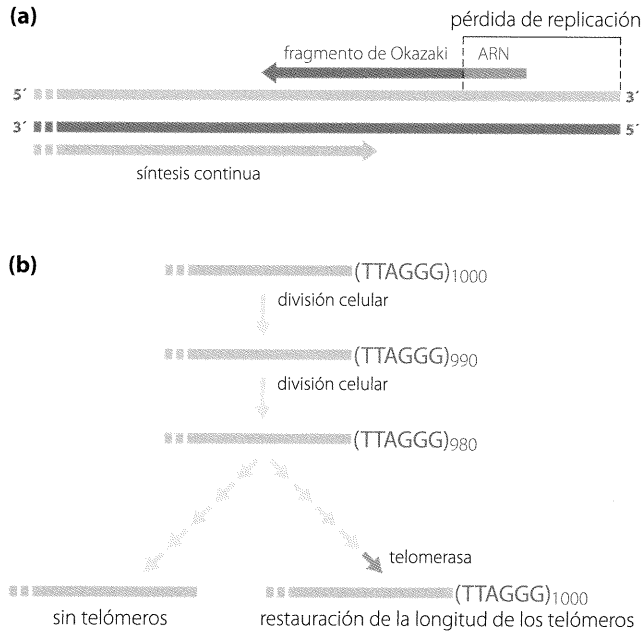


Figura 12.3 – (a) Los mecanismos de replicación de ADN no pueden replicar el extremo 3' final de una molécula. (b) Los telómeros de los cromosomas humanos contienen repeticiones en tándem de unidades TTAGGG. Algunas repeticiones se pierden cada vez que el ADN se replica. Los pérdidas continuas en células cultivadas llevan a la inestabilidad cromosómica. En la línea germinal y en las células cancerosas, la telomerasa puede restaurar la longitud completa de los telómeros.

y del tiempo se llegaría al auténtico origen de la vida. Por tanto, ¿cómo tenemos todavía telómeros? La respuesta es que ciertas células poseen una enzima, la **telomerasa**, que puede restaurar la longitud entera de los telómeros. La telomerasa añade unidades TTAGGG usando su propio modelo construido de ARN y en algunas ocasiones no depende de un modelo externo. La telomerasa restaura la longitud de los telómeros en la línea germinal de cada generación. Las células somáticas normales carecen de telomerasa (el gen está pero no se expresa); en cambio, la mayoría de las células cancerosas la poseen. La reactivación de la telomerasa es un paso importante al adquirir la capacidad de dividirse indefinidamente. Desde luego, la telomerasa parece una excelente diana para un medicamento anticancerígeno, aunque los ensayos han sido desilusionantes.

Oncogenes

La historia de los oncogenes comienza con la investigación del virus del cáncer en los años setenta. Los virus nunca causaban cáncer de la misma forma que causan la gripe; el cáncer nunca es una infección y los virus no causan cáncer en todas las personas infectadas. Sin embargo, unos pocos cánceres en humanos y en animales están asociados causalmente con la presencia de ciertos virus; por ejemplo, el cáncer cervical está asociado con el virus del papiloma. En el laboratorio, **retrovirus transformantes agudos** se podrían rescatar de ciertos tumores animales. Estos virus no serían infectivos, pero sí capaces de transformar eficientemente células de un cultivo en células que, transplantadas en receptores animales, formen un tumor. Los retrovirus tienen un genoma muy simple de ARN consistente en solo tres unidades de transcripción (*Figura 12.4*). Cuando los genomas de retrovirus transformantes agudos fueron analizados se vio que contenían un gen extra, un oncogen. Varias docenas de oncogenes se identificaron a través de estudios de dichos virus, y se denominaron a partir del tumor animal del que el virus había sido aislado (ver *Tabla 12.1*). Otros oncogenes han sido descubiertos por identificación de fragmentos de ADN de células tumorales que podrían transformar células de ratón en tejidos cultivados, causando un crecimiento similar al de las células tumorales.

Estos descubrimientos produjeron especulaciones en el sentido de que todos los cánceres podrían ser el resultado de una infección por un virus portador de un oncogen, algo que se podría prevenir mediante vacunas. Esta idea cautivadora perdió su brillo cuando se descubrió que las células normales contenían oncogenes homólogos a los virales. Algunos virus complejos contiene oncogenes específicos de virus, pero los retrovirus transformantes agudos son vectores de transducción: recogen genes al azar de una célula infectada y los liberan en la

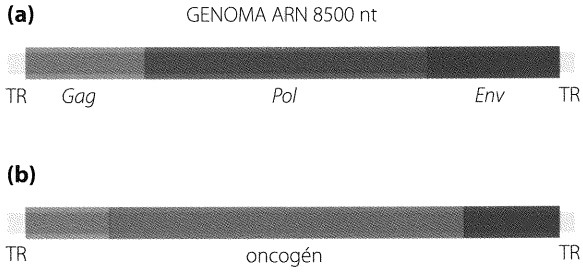


Figura 12.4 – (a) Retrovirus. El ARN genómico comprende tres unidades de transcripción gag, pol y env. Hay una pequeña repetición terminal (TR). (b) Un virus transformante agudo. En un proceso de error al azar, parte del genoma viral ha sido reemplazado por un proto-oncogén celular. La sobreexpresión o una mutación al azar pueden volver oncogénico al gen celular cuando el virus entre en una célula huésped. Los genes virales son parcialmente delecionados, por lo que el virus es incapaz de replicarse.

Tabla 12.1 – Oncogenes virales y su homólogo celular

Gen	Fuente animal	Proto-oncogén celular	
		Localización	Función
ABL	Leucemia murina Abelson	9q34	Transducción de señales (tirosin-kinasa)
ERBB2	Leucemia eritroblástica aviar	17q21	Transducción de señales (receptor tirosin-kinasa)
FES	Sarcoma de virus felino	15q26	Transducción de señales (tirosin-kinasa)
FMS	Leucemia murina Friend	5q33	M-CSF receptor tirosin-kinasa
HRAS	Sarcoma de rata Harvey	11p15.5	Señal de transducción (pequeña GTPasa)
KRAS	Sarcoma de ratón Kirsten	12p12	Señal de transducción (pequeña GTPasa)
MYB	Mieloblastosis aviar	6q22	Control de transcripción (proteína nuclear)
MYC	Mielomacitosis aviar	8q24	Control de transcripción (proteína nuclear)
SIS	Virus del sarcoma simio	22q12	Factor de crecimiento de la cadena B derivado de plaquetas.
SRC	Sarcoma de pollo Rous	20q12	Señal de transducción (tirosin-kinasa)

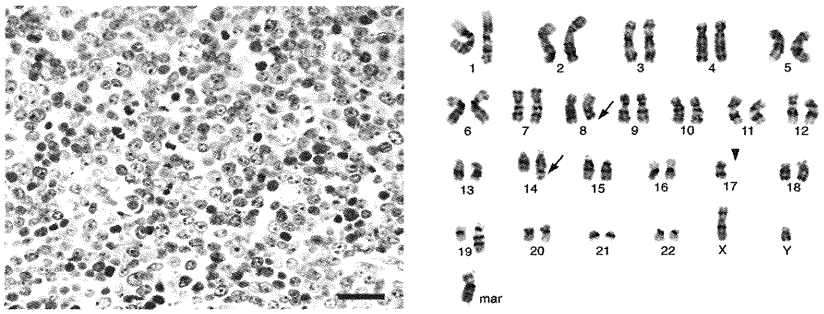
siguiente que infecten. Los genes transducidos reemplazan parte del genoma normal viral, por ello los virus son replicación-defectivos.

Claramente debería haber alguna diferencia entre los oncogenes en los virus, que transforman células, y la versión normal celular, que no. Los oncogenes virales son versiones activadas de los genes celulares (**proto-oncogenes**). La terminología proto-oncogén se suele ignorar en la literatura científica actual y los genes se denominan simplemente oncogenes, pero la distinción entre la forma activada y no activada es crucial.

Función y activación de oncogenes

Un gran avance en el entendimiento molecular de la carcinogénesis se alcanzó cuando la función normal de los oncogenes celulares fue identificada, empezando en los primeros ochenta. Como muestra la *Tabla 12.1*, normalmente, la versión no activada de estos genes tiene un papel en el control de la proliferación celular. Teniendo en cuenta su función normal, es perfectamente comprensible que la versión activada patogénicamente de estos genes pueda ser oncogénica. La activación implica ganancia de función y se puede alcanzar de varias formas.

- *Mutaciones puntuales:* como siempre, una ganancia de función requiere una mutación específica. Por ejemplo, el cáncer de vejiga puede tener la mutación pGlyVal en el (proto)oncogen *HRAS*. Los tres genes RAS humanos (*KRAS, HRAS, NRAS*) codifican una pequeña GTPasa que activa una cascada de señales intracelulares (RAS→RAF→MEK→MAPK) que permiten cambios en la expresión de genes. La ganancia de función produce una versión hiperactiva de la GTPasa que es el gatillo para la expresión excesiva de genes diana.
- *Amplificación*: algunos tumores contienen muchas copias de oncogenes repetidas en tándem, en algunas ocasiones en forma de pequeño cromosoma extra o, en otras, como duplicaciones dentro de un cromosoma. El oncogen *MYC*, por ejemplo, suele estar amplificado en tumores.
- *Reordenamientos cromosómicos* pueden juntar exones de dos genes distantes para hacer un nuevo gen quimérico. Como se mencionó arriba, las células cancerosas normalmente tienen muchas anomalías cromosómicas. Se han dedicado muchas investigaciones a identificar cambios que son específicos de diferentes tipos de tumores y a distinguirlos del resto por el número de cambios al azar. La mayoría de los cambios han sido identificados en leucemias, que son más fáciles de estudiar que los tumores sólidos. La *Tabla 12.2* nos da ejemplos y en el *Cuadro 12.3* se ilustra un caso bien conocido. Estos reordenamientos son excepcionalmente interesantes porque clonando los puntos de rotura se muestra el gen quimérico, lo que ha sido la ruta para descubrir muchos oncogenes. Algunos genes están implicados en muchos reordenamientos diferentes; el gen *MLL* en 11q23 ha sido encontrado en alrededor de 30 fusiones diferentes relacionadas con pacientes de leucemia. Los tests para reordenamientos específicos de genes son una parte importante del diagnóstico molecular del cáncer. Frecuentemente, como en el caso de la familia Tierney (Caso 20), definir el oncogen quimérico proporciona una guía para el pronóstico y tratamiento. Buscar la función del gen quimérico también proporciona una importante visión para entender la biología del tumor.
- *Un reordenamiento cromosómico puede regular la expresión de un oncogen* moviéndolo a una región de cromatina transcripcionalmente muy activa. El clásico ejemplo es el linfoma de Burkitt, un tumor de la infancia que afecta sobre todo a la mandíbula y que se encuentra en África. Su incidencia está asociada con la infección por malaria y virus Epstein-Barr. Las células tumorales tienen somáticamente una característica traslocación recíproca equilibrada adquirida, t(8;14)(q24;q32), *Figura 12.5*. El efecto de la traslocación se produce al mover el oncogen *MYC* del cromosoma 8 a la cercanía del gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas *IGH* en el cromosoma 14. A diferencia de la mayoría de los reordenamientos tumor-específico, el movimiento no crea un gen quimérico. Sin embargo, en los linfocitos, pero no en otras células, la *IGH* se expresa en muy alto nivel. Así, en los linfocitos, se sobreexpresa *MYC*. El resultado es un linfoma. Algunas veces una traslocación alternativa coloca *MYC* al lado del gen de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas en el cromosoma 2 o 22.



(a) (b)

Figura 12.5 – Linfoma de Burkitt.
(a) Histología y (b) cariotipo de la traslocación característica 8;14. También hay anomalías cromosómicas adicionales, como es normal en casos de neoplasia. Reproducido de Molecular Cancer, 2:30; c 2003 Duensing *et al*; licencia Bio Med Central Ltd.

Tabla 12.2 – Reordenamientos cromosómicos equilibrados tumor-específicos que crean genes quiméricos

Reordenamiento	Genes	Enfermedad
t(1;22)(p13;q13)	*RBM15/MKL1*	Leucemia aguda megacarioblástica (FAB-M7)
t(2;13)(q35;q14)	*PAX3/FKHR*	Rabdomiosarcoma alveolar
t(3;8)(p21;q12)	*PLAG1/CTNNB1*	Adenoma pleomórfico de glándula salivar
inv(3)(q21q26)	*RPN1/EVI1*	LMA sin maduración (FAB-M1)
t(4;11)(q21;q23)	*MLL/AFF*	LLA/ linfoma linfoblástico
t(6;11)(q27;q23)	*MLL/MLLT4*	LMMA (FAB-M4)
t(9;11)(p22;q23)	*MLL/AF9*	LLA/ linfoma linfoblástico
t(11;19)(q23;p13)	*MLL/MLLT1*	LLA/ linfoma linfoblástico
t(7;11)(p15;p15)	*NUP98/HOXA11, HOXA13, HOXA9*	LMA con moderación (FAB-M2)
t(9;22)(q34;q11)	*BCR/ABL1*	Leucemia mieloide crónica
t(11;14)(q13;q32)	*IGH/CCND1*	Leucemia linfocítica crónica, linfoma de células del manto
t(15;17)(q22;q12)	*PML/RARA*	Leucemia promielocítica aguda (FAB-M3)
t(12;16)(q13;p11)	*FUS/DDIT3*	Liposarcoma
inv(16)(p13q22)	*CBFB/MYH11*	LMMA (FAB-M4)
t(X;18)(p11;q11)	*SS18/SSX1, SSX2, SSX4*	Sarcoma sinovial
t(14;18)(q32;q21)	*IGH/BCL2*	Linfoma folicular
t(12;21)(p13;q22)	*ETV6 (TEL)/RUNX1 (AML1)*	LLA/ linfoma linfoblástico
t(8;21)(q22;q22)	*RUNX1/ETO*	LMA con maduración (FAB-M2)

Ver http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/RecurrentAberrations, extensa base de datos de reordenamientos establecidos por el Dr. Felix Mitelman. Los reordenamientos han sido particularmente definidos en las leucemias y linfomas porque en estas enfermedades las células tienen un único clon y son más fáciles los análisis citogenéticos que en los tumores sólidos. LLA, leucemia linfoblástica aguda; LMA leucemia mieloblástica aguda; LMMA leucemia mielomonocítica aguda.

Cuadro 12.3

El cromosoma Philadelphia y el gen quimérico *BCR-ABL*

Los linfocitos del 90% de los pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) contienen un cromosoma pequeño anormal, el cromosoma Philadelphia (Ph1) (*Figura 1*). Es un hecho lo bastante constante que hace que el diagnóstico de LMC sea cuestionable en su ausencia. Se vio que el cromosoma Ph1 era el resultado de una traslocación equilibrada recíproca 9;22, t(9;22)(q34.1;q11.2). La zona de unión de la traslocación crea un gen quimérico nuevo en el cromosoma Ph1 por la unión de la parte 5´ del gen *BCR* del cromosoma 22 en la parte 3´ del gen *ABL* del cromosoma 9. El gen resultante *BCR-ABL* siempre contiene 1 exón de *BCR* y normalmente los siguientes 10 exones, unidos a los exones 2-11 de *ABL* (*Figura 2*).

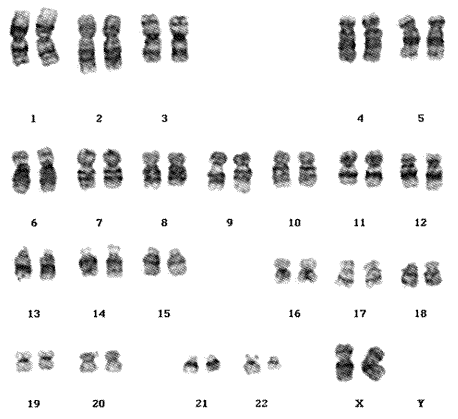


Figura 1 – Cariotipo de una metafase con t(9,22).
Los cromosomas anormales 9 y 22 (cromosoma Philadelphia) están en el lado derecho de cada par. Foto cortesía del Dr. Christine Harrison, University of Southampton.

ABL es un conocido oncogen que fue identificado primero en un retrovirus transformante agudo aislado del sarcoma de rata Abelson (*Tabla 12.1*). Su producto es una tirosina quinasa que es parte del sistema de señalización que controla el ciclo celular. La actividad de la quinasa está muy controlada, en parte por el dominio codificado en el exón 1. El gen quimérico es transcrito y traducido; su producto es una tirosina quinasa que es activa constitucionalmente. Tal ganancia de función en un importante control del crecimiento puede llevar a la célula a un crecimiento descontrolado.

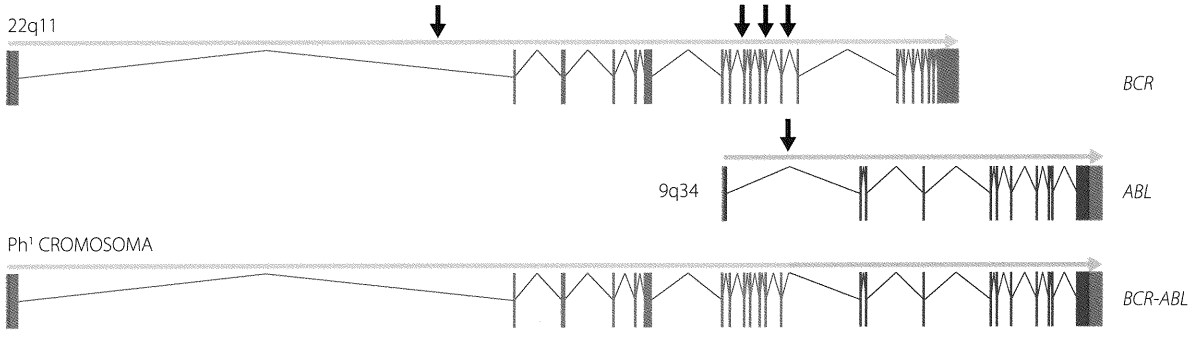


Figura 2 – Unión de los genes *BCR* y *ABL* que produce el gen quimérico *BCR-ABL*. El punto de corte de BCR puede estar en diferentes intrones.

Como se mencionó en el *Capítulo 8*, dado que esta tirosina quinasa anormal es característica de la LMC, un medicamento que actúa sobre ella específicamente ha mostrado ser muy efectivo induciendo la remisión en pacientes con LMC.

Genes supresores de tumores

Las formas raras de cáncer que se heredan han sido muy importantes en el comprensión de la carcinogénesis. En 1971, Alfred Knudson enunció una hipótesis acerca de la relación entre la versión hereditaria o esporádica de cáncer. Realizó

la hipótesis de que los pasos tempranos de la carcinogénesis requerían que la célula fundadora de un tumor sufriera dos impactos (hits); pueden ser mutaciones simples o algún otro cambio genético. En los cánceres esporádicos ambos *hits* serían acontecimientos al azar, cada uno con una baja probabilidad. En la versión familiar uno de los hits sería heredado. Todas las células de una persona susceptible serían portadoras de un hit, por lo tanto, solo se requiere que una célula en el tejido diana sufra un hit adicional para desarrollar un tumor. La susceptibilidad familiar se ha heredado de un progenitor como un rasgo dominante. El fenotipo celular que permite a una célula fundar un tumor es recesivo, requiriendo dos hits (es útil recordar que dominante y recesivo son propiedades de los fenotipos y no de los genes o de las mutaciones ver *Figura 1.13*).

Knudson formuló esta hipótesis en relación con el retinoblastoma (RB), un raro tumor infantil de la retina. El RB puede ser unilateral o bilateral, una observación perspicaz nota que la forma familiar frecuentemente es bilateral, el RB esporádico es siempre unilateral. Una observación similar fue hecha acerca del cáncer de mama. En el RB familiar hay en muchas ocasiones tumores independientes múltiples en el ojo. Claramente, los retinoblastos en personas con RB familiar tienen una fuerte tendencia a volverse tumorigénicos; considerando el tamaño de la población celular diana, la probabilidad de una trasformación es compatible con tasas típicas de mutación (*Figura 12.6*).

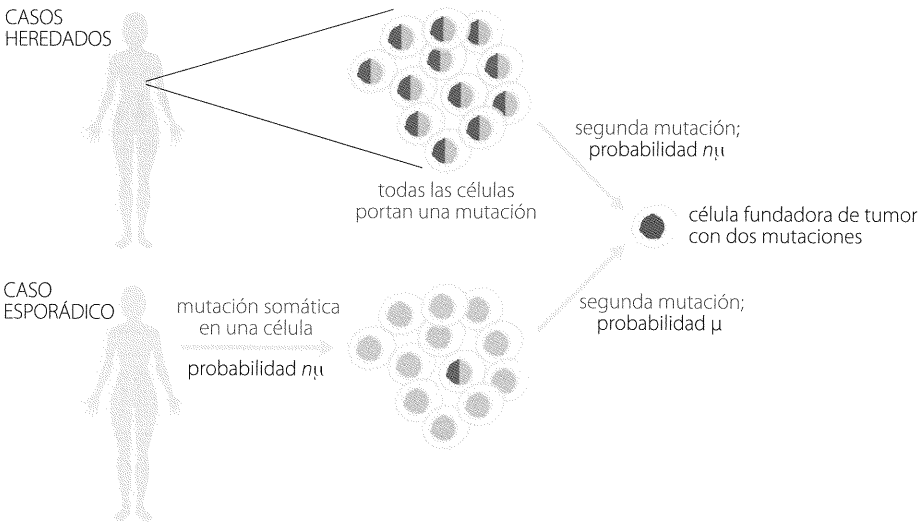


Figura 12.6 – Relación entre la forma esporádica y heredada del mismo tumor.
El tejido diana contiene *n* células y la oportunidad de que una célula sufra una pérdida de función por mutación en el gen supresor de tumores es μ.

Comprobar la hipótesis de los dos hits

Un artículo clave de 1983 publicado por Cavenee *et al.* mostraba cómo la hipótesis de Knudson para el RB podría ser confirmada, e inició la agenda para los próximos 20 años en la investigación de los cánceres familiares. Tenía la sospecha de que el "hit" en el RB podría estar en el cromosoma 13, ya que una familia en la que había RB-familiar cosegregaba con una anomalía de este cromosoma. Cavenee y sus colegas recogieron células y ADN de tumores de pacientes con RB esporádico. Usando una combinación de análisis citogenéticos y *Southern blot*

con sondas para el cromosoma 13, buscaron diferencias entre los tumores y las células normales de un mismo paciente. Los análisis citogenéticos mostraron que algunos tumores habían perdido o tenían copias extra del cromosoma 13. El *Southern blot* mostró que en algunos casos en los que el ADN normal (sangre) del paciente era heterocigoto para un polimorfismo, el tumor era homocigoto. Correlacionando las observaciones citogenéticas y la ocurrencia de la **pérdida de heterocigosidad** en tumores individuales, los investigadores fueron capaces de hacer una descripción conjunta del mecanismo cromosómico que producía uno de los hits de Kundson (*Figura 12.7*).

Trabajos posteriores añadieron al escenario que, en los casos heredados, el segundo *hit* siempre eliminaba la secuencia normal. Las células tumorales se quedan con la secuencia que el paciente ha heredado de la rama afectada de su familia. Años después, cuando el gen de RB1 fue clonado y la PCR hizo posible escanearlo para buscar mutaciones, una variedad de mutaciones de pérdida de función han sido identificadas en los alelos de la susceptibilidad hereditaria de RB. La adquisición de mutaciones somáticas también se puede demostrar en el gen normal en los tumores que no tienen anomalías cromosómicas relevantes.

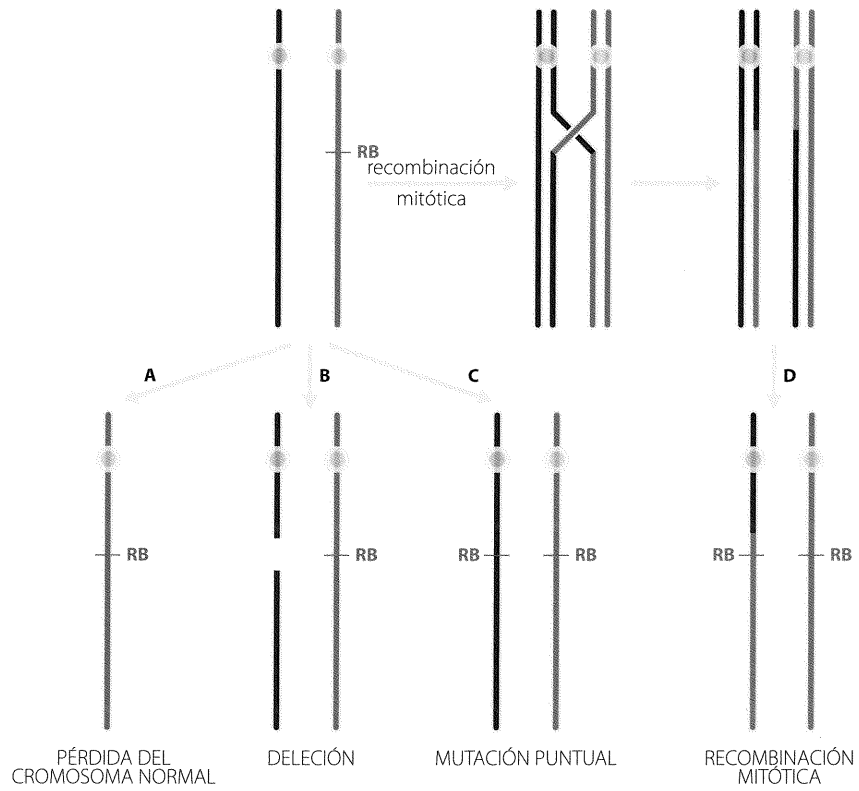


Figura 12.7 – Mecanismos en retinoblastoma.
La mutación inicial puede ser heredada o somática. Los mecanismos A, B y D dan como resultado una pérdida de heterocigosidad (en B, solo para marcadores cerca del locus de RB; en D solo para marcadores lejanos al entrecruzamiento). En el estudio original de Cavenee, algunos tumores duplican la copia remanente del cromosoma 13 después de la pérdida cromosoma normal por el mecanismo A.

El trabajo sobre el RB confirma la existencia de genes ST (supresores de tumores) y demuestran que la hipótesis de *dos-hits* explica las bases de los síndromes de cáncer familiar. Esto sugiere dos formas de identificar genes ST:

- Identificando la región cromosómica de pérdida de heterocigosidad en tumores esporádicos por comparación del ADN del tumor y el ADN constitucional (sangre) del mismo paciente.
- Mapeo y clonaje posicional de los genes mutados en familias cancerosas.

El análisis de pérdida de heterocigosidad ha producido resultados decepcionantes en una gran cantidad de trabajos. El problema es que los tumores completamente desarrollados contienen una colección heterogénea de células con muchos cambios cromosómicos que dificultan extraer patrones claros de pérdida específica de una pequeña región cromosómica. La introducción de los array-CGH (ver *Figura 4.7*) promete hacer esta línea de búsqueda más productiva, porque por primera vez proporcionará un cuadro de los cambios del tumor en todo su genoma. Mientras tanto, el ligamiento familiar permite la identificación de la susceptibilidad hereditaria en muchos síndromes de cánceres familiares. Una vez que el gen responsable ha sido identificado, los tumores esporádicos se pueden analizar para buscar mutaciones en el mismo gen. De esta forma, un importante número de genes ST han sido identificados (*Tabla 12.3*).

Tabla 12.3 – Síndromes de cánceres familiares con mutaciones heredadas en genes supresores de tumores

Síndrome	Número OMIM	Gen	Localiz.
Retinoblastoma	180200	*RB1*	13q14
Poliposis adenomatosa familiar	175100	*APC*	5q21
Cáncer de colon hereditario no-polipósico	120435 120436	*MSH2* *MLH1*	2p22 3p21
Cáncer de mama familiar	113705 600185	*BRCA1* *BRCA2*	17q21 13q12
Síndrome de Li-Fraumeni	151623	*TP53*	17p13
Síndrome de Gorlin	109400	*PTC*	9q22
Ataxia-telangiectasia	208900	*ATM*	11q23
Neurofibromatosis 1	162200	*NF1*	17q11
Neurofibromatosis 2	101000	*NF2*	22q12
Enfermedad de Von Hippel-Lindau	193300	*VHL*	3p25
Neoplasia múltiple endocrina 1	131100	*MEN1*	11q13
Neoplasia múltiple endocrina 2	171400	*RET*	10q11
Melanoma familiar	155601	*CDKN2A*	9p21

La función normal de los genes supresores de tumores

Los genes ST actúan restringiendo el crecimiento celular, y están implicados en una gran variedad de puntos de control. Dos de las principales áreas son los puntos de control del ciclo celular y de la apoptosis. En un conjunto de células en crecimiento continuo, el ciclo celular se puede dividir en cuatro etapas (*Figura 12.8*). La progresión: del ciclo está controlada por una serie de puntos:

- *El punto de control G1-S*: las células no deben de ser capaces de empezar la replicación de su ADN hasta que todo el daño en el ADN haya sido reparado; las células con daños irreparables se dirigen al suicidio por apoptosis.
- *El punto de control de la fase S* opera mientras la replicación del ADN está ocurriendo; diferentes orígenes de replicación se vuelven activos en diferentes momentos durante la fase S y los puntos de control *previenen la iniciación de nuevos orígenes si el ADN está dañado.*
- *El punto de control G2/M* impide a las células la iniciación de la mitosis cuando el daño en el ADN es irreparable.
- *El punto de control del huso* impide la separación de las cromátidas en anafase hasta que todos los centrómeros de los cromosomas están unidos a la fibras del huso.

Los primeros tres puntos de control representan diferentes respuestas a posteriori de la maquinaria que detecta el daño en el ADN, especialmente roturas de la doble hélice. Esta maquinaria implica a muchos genes ST. Los mecanismos de puntos de control están altamente conservados a lo largo de la evolución. La mayor parte del conocimiento del control del ciclo celular humano viene de los estudios de modelos en organismos, especialmente en levaduras. El Premio Nobel de Medicina del año 2001 fue para L. Hartwell, T. Hunt y P. Nurse por su trabajo en estos controles (véase en http://nobelprize.org/medicine/laureates/2001/). El progreso del ciclo está controlado por las ciclinas, una familia de proteínas cuyo nivel en la célula fluctúa de acuerdo con la fase del ciclo celular. Las ciclinas

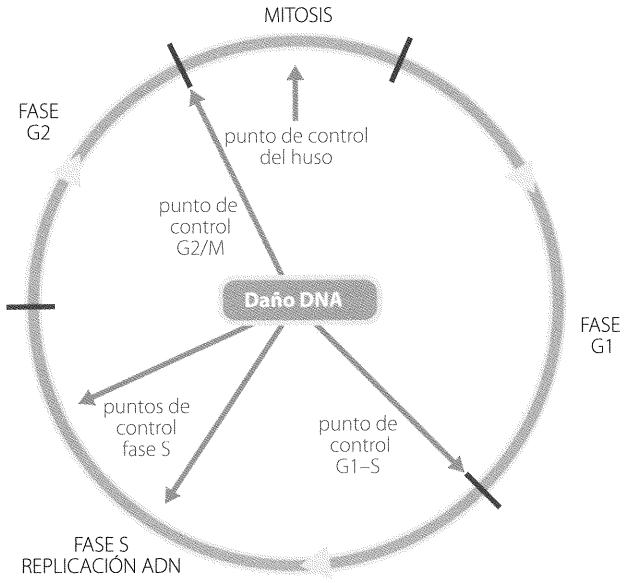


Figura 12.8 – El ciclo celular y sus puntos de control.

operan activando una serie de proteínas quinasas, las quinasas dependientes de ciclinas. Los inhibidores específicos de CDK neutralizan las ciclinas.

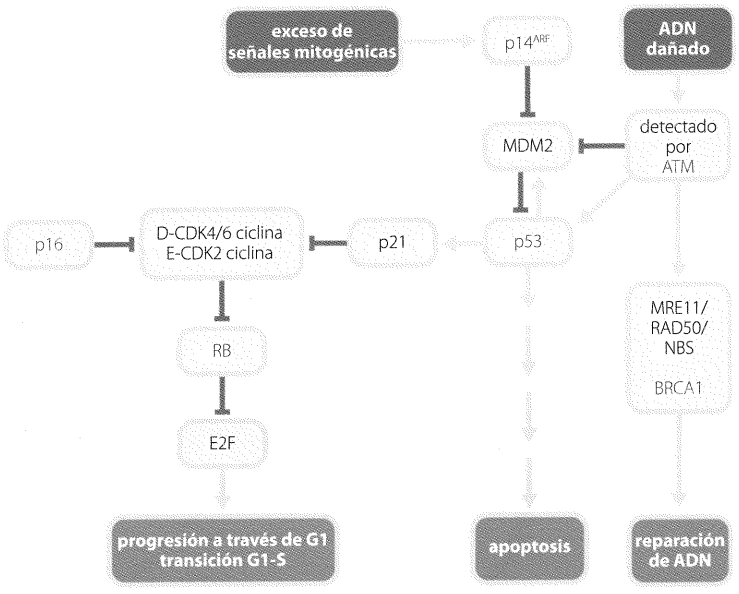
El punto de control G1-S, en particular, implica un impresionante grupo de genes ST (*Cuadro 12.4*).

- *La proteína RB (pRB)* une e inhibe la E2F, un factor de transcripción que activa la expresión de muchos genes requeridos para el paso de la fase G1 a S. La fosforilación de la pRB por las CDKs la inactiva y libera E2F activado.
- *p53,* el producto del gen TP*53*, está normalmente unido por MDM2 y degradado. p53 estimula la trascripción de *MDM2* y de ese modo regula su propia actividad a un nivel más bajo. Varias señales inactivan MDM2, permitiendo que el nivel de p53 aumente. Dependiendo de las circunstancias, puede en algunos casos causar la parada del ciclo celular en algunas células a través de la acción de p21 o marcar la célula para apoptosis. p53 es inactivado en una alta proporción por mutaciones somáticas en todas las células cancerosas; las mutaciones heredadas causan el síndrome de cáncer familiar Li-Fraumeni.

Cuadro 12.4

El punto de control G1–S

La progresión a través del ciclo celular está gobernada fundamentalmente por la disponibilidad de las proteínas específicas ciclinas. Estas activan las CDKs. Las quinasas actúan como efectores por fosforilación de un amplio rango de dianas posteriores en el ciclo; están reguladas por la disponibilidad de su afinidad por las ciclinas y por varios inhibidores. La progresión a través de la fase G1 hasta la fase S está gobernada por las ciclinas D y E y sus quinasas. Una compleja red de controles anteriores modula su actividad. La figura muestra solo una parte de la red, más detallado se puede encontrar en algún libro de texto de biología.



Algunos de los controles e interacciones que gobiernan el progreso G1-S. Los genes ST identificados a través de los cánceres familiares se muestran en rojo. ⊣ muestra la acción inhibitoria → muestra la acción estimulante.

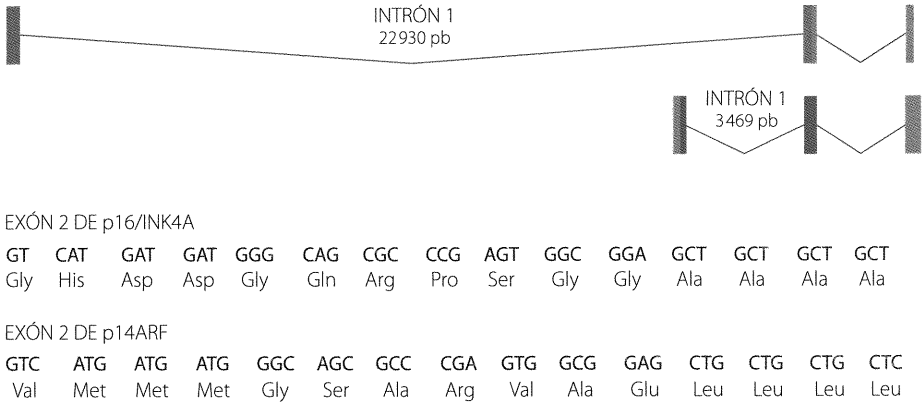


Figura 12.9 – El gen *CDKN2A* codifica dos proteínas completamente diferentes, p16 y p14^{ARF}, ambas funcionan en el control del ciclo celular. *CDKN2A* está delecionado frecuentemente en las células del tumor. ARF, marco de lectura alternativo.

- *p16* y *p14^{ARF}* son productos del mismo gen, *CDKN2A* (*Figura 12.9*). El uso de promotores alternativos y primeros exones hacen que la secuencia codificante del exón 2 se lea en diferentes marcos de lectura para los dos productos, que al final no comparten homología de aminoácidos. Notoriamente, ambos funcionan en el control del ciclo celular. La deleción de este gen es un modo eficiente de interrumpir el control del ciclo celular, y es un acontecimiento común en las células de un tumor. p16 es un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina. Las mutaciones heredadas de p16 se encuentran en muchas familias con melanoma familiar; esto afecta solo al producto del gen p16. Las mutaciones heredadas que afectan solo a p14^{ARF} son poco frecuentes, pero el promotor de p14 es epigenéticamente silenciado con frecuencia en tumores.
- *Proteína ATM* puede ser el primer sensor de la roturas de doble cadena del ADN. La activación ATM fosforila muchas proteínas, incluyendo MDM2 (inactivándolo), p53, CHK2, BRCA1 y el complejo reparador de ADN MRE11/RAD50/NBS (todas ellas activadas por fosforilación).

Es notable que muchos genes ST codifiquen proteínas extremadamente largas. Algunos ejemplos incluyen las proteínas codificada por *APC* 2843 residuos de aminoácidos), *ATM* (3056 aminoácidos), *BRCA1* (1863 residuos), *BCRA2* (3418 residuos) y *NF1* (2839 residuos). No todos los genes ST codifican proteínas largas (los dos productos del gen *CDKN2A* son de 156 y 173 residuos de longitud), y no todas las proteínas largas tienen un papel en el cáncer (algunas de las proteínas más largas son las proteínas estructurales musculares como la distrofina, 3685 residuos, y titin, 19146 residuos). Sin embargo, la lista de la *Tabla 12.3* sugiere que la pérdida de función de genes que codifican proteínas largas no estructurales es un hecho inicial frecuente en tumorigénesis. Algunas proteínas suelen tener un papel estructural a nivel molecular, aunque no a nivel microscópico. Interactúan con muchas otras proteínas y sirven como andamiaje para el ensamblaje de una larga maquinaria multiproteica que lleva a cabo muchas tareas celulares. La pérdida de función en algunos puntos nodales en la red de interacciones entre las células puede ser una forma poderosa de interrumpir las funciones celulares normales.

Una solución desesperada: apoptosis

La apoptosis es un proceso específico activo que es provocado por varios estados anormales celulares, así como una parte importante del desarrollo normal (para separar los dedos de una mano en el desarrollo de un embrión, por ejemplo). El mecanismo implica la activación de una cascada de enzimas proteolíticas llamadas caspasas. Las caspasas pueden ser activadas a través perturbaciones de la mitocondria, con liberación del citocromo C, o a través de la acción de las proteínas FAS en conjunción con los llamados receptores de la muerte. Esta potente maquinaria suicida necesita estar bajo un estrecho control, y los circuitos reguladores de apoptosis están muy implicados.

Entre las situaciones que pueden provocar la apoptosis, está el daño irreparable de ADN y las señales excesivas de crecimiento. La proteína p53 es la clave central de este proceso. Es activada por fosforilación de residuos específicos y/o inactivación de su inhibidor MDM2. Como muestra el *Cuadro 12.4*, p53 estimula la expresión de la proteína p21, que actúa para promover la parada del ciclo celular. p53 también estimula la transcripción de muchas proteínas que están implicadas tanto en el camino de apoptosis mitocondrial como en el mediado por FAS. Por su papel de llave en todo este proceso, p53 ha adquirido la denominación de "guardián del genoma". p53 es uno de los genes más mutados en todos los cánceres.

12.3. Estudio de pacientes

CASO 20 | Familia Tierney | 200 | 213 | **310** | 376

- Niño de 4 años, Jason
- Pálido con taquicardia y grandes hematomas
- ? Leucemia linfocítica aguda
- Test y chequeo en médula ósea para el diagnóstico
- Análisis de la enzima TPMT previo al tratamiento con mercaptopurina

La leucemia linfoblástica aguda infantil (LLAi) es una neoplasia de precursores de células B o células madre. El 25% de los casos tienen una traslocación recíproca equilibrada 12;21 con puntos de corte en 12p13 y 21q22. En la unión de la traslocación, la porción 5′ del gen *TEL (ETV-6)* y casi toda la secuencia codificada del gen *AML1 (RUNX1 o CBFA2)*, se juntan creando un gen de fusión. Experimentos de pérdida de función en ratones muestra que ambos *TEL* y *AML1* son críticos para la hematopoyesis. Cada gen codifica un factor de transcripción. *AML1* codifica para la subunidad alfa del factor de unión central, un regulador en la formación de células madre hematopoyéticas. La fusión inhibe la actividad transcripcional normal mediada por *AML1*, resultando alterada la capacidad de renovarse y diferenciarse de las células madre hematopoyéticas. Ambos genes son compañeros de fusión con variedad de otros genes que codifican quinasas o factores de trascripción en leucemias linfoides y mieloides. La fusión *TEL-AML1* parece ser la única en células B progenitoras de LLA.

La posición de los puntos de rotura de *TEL/AML1* en la región subtelomérica de tinción clara del cromosoma hace que la traslocación sea difícil de detectar por cariotipo convencional. El diagnóstico está basado en el FISH. Las células en interfase de Janson fueron hibridadas con sondas de diferentes colores para los genes *TEL* y *AML1*. Uno de los puntos coloreados que marcaban el gen *TEL* siempre estaba adyacente a uno de los puntos de *AML1*, confirmando la presencia del gen de fusión *TEL/AML1* (*Figura 12.10*). Esto fueron buenas noticias porque los individuos con reordenamientos de *TEL* normalmente muestran una

excelente respuesta a la quimioterapia. Como se describió en el *Capítulo 8*, la inducción y consolidación del tratamiento fue un éxito, pero había problemas iniciales con el mantenimiento del tratamiento a largo plazo porque Jason tenía deficiencia de tiopurina metil-transferasa, lo que le hacía hipersensible a uno de los medicamentos utilizados, la 6-mercaptopurina. Con una dosis baja del medicamento recuperó la salud y quedó libre de la enfermedad.

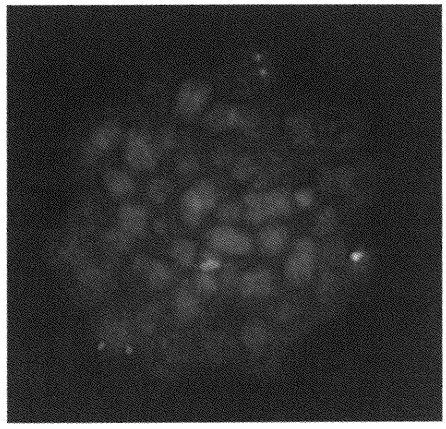


Figura 12.10 – Metafase con fusión *TEL–AML1*. La señal verde está en el cromosoma 12 normal, una señal roja está en el cromosoma 21 normal y una está en el derivado del cromosoma 12. El amarillo es la señal de fusión *TEL-AML1* en el cromosoma 21 derivado. Foto cortesía del Dr. Christine Harrison, university of Southampton.

CASO 23 | Familia Wilson | 293 | **311** | 376

- ? Cáncer de mama familiar
- Análisis de la mutación en el ADN.

Dado que una de cada ocho mujeres en Estados Unidos o Reino Unido es probable que desarrolle cáncer de mama en algún momento a lo largo de su vida, no es una sorpresa que muchas familias tengan más de un caso. En mujeres afectas, del 5 al 10% tienen una madre o una hermana con cáncer de mama, y cerca del doble tienen un familiar afecto en primer o segundo grado. Muchas de estas son coincidencias, pero el análisis estadístico sugiere que en el 5-10% de las familias la enfermedad es de origen familiar. En 1990, el análisis de ligamiento de una larga colección de familias multicasos indicaba un posible locus de susceptibilidad para el cáncer de mama de comienzo temprano en el cromosoma 17. Después de cuatro años de trabajo intensivo el gen *BRCA1* fue identificado por clonación posicional. Más análisis en familias *BRCA1* negativo llevaron a la identificación del gen *BRCA2* en el cromosoma 13.

BRCA1 y *BRCA2* son dos genes grandes (*Figura 12.11*). *BRCA1* tiene 24 exones que codifican una proteína de 1863 aminoácidos, y *BRCA2*, por su parte, tiene 28 exones que codifican una proteína de 3418 aminoácidos. Como se mencionó arriba, las proteínas grandes probablemente tienen múltiples funciones y muchos patrones de interacción. Nuestro conocimiento del papel de estas proteínas en las células es todavía muy incompleto. Uno de los papeles principales consiste en detectar el daño en el ADN y señalizar su presencia a los controles del ciclo celular. También hay evidencias del papel de estas proteínas en el control de la transcripción. *BRCA1* y *BRCA2* se comportan como genes ST, estos casos familiares frecuentemente implican una pérdida de la función hereditaria, y los tumores en los casos familiares muestran pérdida o inactivación del alelo normal restante. Curiosamente, sin embargo, los tumores de mama esporádicos muy rara

vez tienen mutaciones *BRCA1/2*, aunque el 10%-15% de los tumores esporádicos silencian *BRCA1/2* epigenéticamente. Podría ser que, aunque las células con dos mutaciones *BRCA1/2* tienen un significado potencial tumorigénico, las que tienen una sola mutación no incrementan su poder sobre las células normales. En este caso, hay rutas alternativas que tendrían una alta probabilidad de producir un tumor esporádico. Apoyan esto los estudios de expresión de arrays que muestran diferentes patrones de expresión de genes en tumores esporádicos de mama sin implicación de *BRCA1*, comparado con aquellos con alguna mutación o silenciamiento de *BRCA1*.

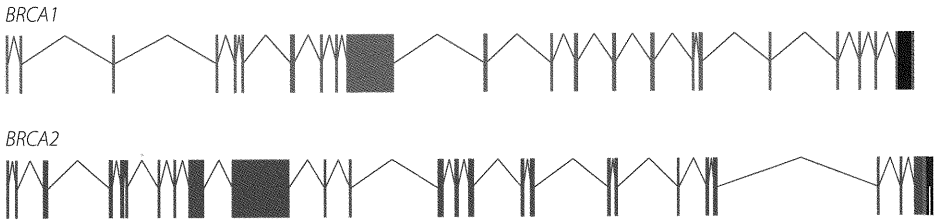


Figura 12.11 – Estructura de los exones de los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Los dos genes y proteínas no comparten homología. El estudio de la expresión de arrays de la *Figura 12.16* sugiere que hay implicadas diferentes rutas dentro de la célula. Ambos genes tienen un exón central muy largo (3426 y 4932 pb respectivamente).

El Centro de Información del Cáncer de Mama del Instituto Nacional del Genoma Humano (http://research.nhgri.nih.gov/bic/) enumera entre 1500 y 1800 cambios de secuencia en *BRCA1* y *BRCA2*. Un desconocido número de estas son variantes no patogénicas descubiertas casualmente. Muchos de los cambios claramente patogénicos son pequeñas deleciones o inserciones que alteran el marco de lectura, mutación de sitios de corte o deleciones de uno o más exones enteros. Pueden ser identificados a través de la secuenciación o mediante algunos de los métodos estándar de estudio de genes (*Capítulo 5*). Las deleciones de un exón entero se detectan mejor por MLPA (*Figura 5.8*). Como la mayoría de las mutaciones prematuras de terminación, se espera que disparen la degradación mediada sin sentido del ARNm, por lo que la mutación actúa como alelo nulo, no produciendo (o quizá muy poco) proteína truncada.

Los judíos ashkenazi son un caso especial. Tres mutaciones específicas del marco de lectura (c.185delAG y c.5382insC en *BRCA1*, y c6174delT en *BRCA2*) son frecuentes en esta población, presumiblemente por un efecto fundador (*Capítulo 10*). Una revisión de 5.318 mujeres ashkenazi sanas encontró 120 (2,2%) portadoras de una u otra de las tres mutaciones. Esta frecuencia contrasta con la frecuencia de 0,2% de todas las mutaciones de *BRCA1/2* en mujeres blancas no ashkenazi en Estados Unidos o Reino Unido. La alta frecuencia de estas mutaciones específicas hace que los tests genéticos en los ashkenazi sean importantes y sencillos. Desde luego, excluir estas tres mutaciones no quita el riesgo de alguna otra mutación *BRCA1/2* o en otro gen que pueda poner a las personas en alto riesgo. Otras poblaciones, por ejemplo los francocanadienses, islandeses y pakistaníes, también tienen sus particulares mutaciones fundadoras.

El riesgo a lo largo de la vida de un portador de una mutación ha sido estimado variablemente entre 30% y 85%. Esto ilustra un interesante hecho de los tests de susceptibilidad. La estimación inicial estaría hecha en multicasos familiares grandes en los que la mutación se encontró por primera vez. Pero estas familias estaban seleccionadas por tener muchos casos afectados, y la estimación inicial

del riesgo se hizo en un grupo sesgado de familias. En las revisiones basadas en estudios de población el riesgo es más bajo. A pesar de todo, el riesgo es todavía sustancial comparado con el riesgo de personas que no son portadoras de la mutación, y sobre todo en mujeres con una fuerte historia familiar. Por lo tanto, hay una considerable demanda de cribado de mutación. Dado que son genes grandes y la mutación de pérdida de función puede ser encontrada en cualquier lugar dentro del gen, los cribados de mutaciones son laboriosos y caros. Los clínicos necesita priorizar las familias a cribar, y esto se hace basándose en la historia familiar.

Los marcadores de mutaciones en *BRCA1/2* incluyen:

- casos con un inusual comienzo temprano
- casos bilaterales (compara con el ejemplo de RB)
- casos con cáncer de mama masculino (es un signo particular de mutaciones en *BRCA2*)
- familias con cánceres de ovario y mama (es un signo particular de mutaciones en *BRCA1*)

Ninguno de estos hechos es específico de cáncer de mama *BRCA1/2,* pero el índice de riesgo ha sido desarrollado teniendo en cuenta estos factores. La *Tabla 12.4* muestra uno de estos índices (Evans *et al.*, 2004). Este permite a los médicos evaluar la probabilidad de que un caso dado tenga una mutación en *BRCA1/2.*

Tabla 12.4 – Sistema de puntuación para evaluar la probabilidad de encontrar una mutación *BRCA1* o *BRCA2* en una familia

Cáncer, edad al diagnóstico (años)	Puntos para *BRCA1*	Puntos para *BRCA2*
Cáncer de mama femenino, <30	6	5
Cáncer de mama femenino, 30–39	4	4
Cáncer de mama femenino, 40–49	3	3
Cáncer de mama femenino, 50–59	2	2
Cáncer de mama femenino, >59	1	1
Cáncer de mama femenino, <60	5 si excluimos *BRCA2*	8
Cáncer de mama femenino, >59	5 si excluimos *BRCA2*	5
Cáncer de ovario, <60	8	5 si excluimos *BRCA1*
Cáncer de ovario, >59	5	5 si excluimos *BRCA1*
Cáncer de páncreas	0	1
Cáncer de próstata, <60	0	2
Cáncer de próstata, >59	0	1

La puntuación suma todos los casos en la familia que son compatibles con susceptibilidad hereditaria dominante. La puntuación final intenta representar el % de riesgo de encontrar la mutación. Datos de Evans *et al.* (2004), reproducidos aquí con permiso del Grupo de Publicaciones BMJ.

En la familia Wilson, el sistema de puntuación de la *Tabla 12.4* al árbol genealógico (*Figura 12.1a*) se sugiere que hay un riesgo del 18% de mutación en *BRCA2* y del 15% de mutación en *BRCA1* si el cribado de *BRCA2* es negativo. Nótese que no hay puntuación para el cáncer de próstata del abuelo paterno de Wendy, ya que si el problema familiar es causado por una mutación en *BRCA1/2* heredada, el árbol genealógico muestra que el problema está en el lado materno de la familia de Wendy. La presencia de cáncer de mama masculino, y la ausencia de cáncer de ovario, refuerza la sospecha de que es una familia *BRCA2*. El resultado fue lo bastante alto como para dar prioridad al análisis del ADN familiar.

Un trozo del tumor extirpado de Wanda se recuperó del archivo del laboratorio de anatomía patológica y se extrajo el ADN. Finalmente, el test reveló en el tumor una deleción de un solo nucleótido en el exón 18 de *BRCA2*. La deleción del nucleótido 8525 en el codón 2766 creó una mutación de marco de lectura, dejando que el codón 2776 fuera leído como un codón de parada. No se identificó una segunda mutación en el tumor, si bien no fue hecha una revisión de pérdida de heterocigosidad porque no había una muestra del ADN normal de Wanda (sangre) para comparar. La presencia de esta mutación en el tumor sugiere sólidamente que es una familia *BRCA2*.

Antes de poder ofrecer los tests de mutación a los miembros de la familia fue necesario descubrir si la mutación encontrada en el tumor era el primer o segundo *hit*; si era el segundo *hit*, la mutación familiar permanecería sin identificar. Se estableció contacto con Amy en Nueva Zelanda, y tras discutirlo con Wendy, estuvo de acuerdo en proporcionar una muestra de sangre para el test. A diferencia de la sangre, el ADN es estable y puede ser enviado alrededor del mundo por correo normal. Fue fácil para el centro genético de Wendy realizar el test en la muestra de Amy específicamente para la mutación c.8525delC, y el resultado fue positivo. Ahora que la mutación familiar ha sido identificada, Wendy, William y Verónica dieron muestras de ADN para el test. Las muestras fueron analizadas solo para la mutación familiar ya identificada. Este mostró que Verónica y William portaban la mutación, pero Wendy no.

Wendy quedó aliviada por las noticias, pero era importante aconsejarla para estar seguros de que había entendido que sigue perteneciendo a la población de riesgo de desarrollar un cáncer de mama esporádico, y que sería prudente que tomara parte en el programa de cribado estándar de mamografías. Esto también fue una oportunidad para remarcar que el riesgo de cáncer de mama esté muy influenciado por el estilo de vida, y que la mujeres (incluyendo las portadoras de mutaciones *BRCA1/2*) pueden reducir su riesgo alrededor del 40% perdiendo peso y realizando ejercicio moderado. Verónica era portadora de la mutación y, por lo tanto, tenía un riesgo alto. Las opciones para ella incluyen no hacer nada, cambios en los hábitos de vida, entrar en un programa mejorado de seguimiento con mamografías anuales, tomar Tamoxifeno con la esperanza de que podría reducir su riesgo, o el paso más radical: la mastectomía profiláctica. William no tiene un alto riesgo de cáncer de mama porque es raro en hombres. Por otro lado, aunque el relativo de cáncer de próstata en portadores de mutación en *BRCA2* es solo moderado, el riesgo absoluto es alto, y fue advertido de que debería hacerse cribados regulares. Algún hijo podría necesitar consejo acerca de su riesgo para el cáncer de mama.

- Historia familiar de problemas intestinales
- ? FAP

El gen *APC* (OMIM 175100) en el cromosoma 5q21-22 fue identificado como causa de FAP por clonación posicional, dirigida por publicaciones de un paciente afectado con una deleción intersticial de 5q. *APC* actúa como un clásico gen ST. Los casos familiares heredan una mutación del *APC* y somáticamente inactivan el alelo normal en el tumor. Además, en contraste con la situación de *BRCA1/2* en el cáncer de mama, la mutación o la pérdida de ambos alelos de *APC* es común en muchos sucesos tempranos en el desarrollo de un cáncer colorectal esporádico común (ver a continuación).

La proteína APC es otra larga proteína multifuncional (2843 aminoácidos). Parece implicada en varios procesos diferentes de la célula, incluyendo las señales de transducción en la vía Wnt, adhesión celular e interacciones con el citoesqueleto. La función más clara relacionada con el cáncer es su papel en el control de los niveles de ß-catenina (*Figura 12.12*). ß-catenina es un coactivador transcripcional. En el núcleo de las células se asocia con el factor de trascripción TCF4 y promueve la trascripción de varios genes diana incluyendo la ciclina D1 y el oncogen *MYC*. Esto está controlado por el sistema de señales Wnt. En ausencia de la señal Wnt, las proteínas APC forman un complejo con Axin y GSK3ß que degrada la ß-catenina. La seña WNt inhibe la formación del complejo, permitiendo a ß-catenina entrar en el núcleo. Las mutaciones en APC permiten que el nivel de ß-catenina aumente independientemente de la señal Wnt. Los tumores colorectales que carecen de mutaciones en APC pueden tener una ganancia de función por mutaciones en ß-catenina o mutaciones de pérdida de función en axin que presumiblemente tienen un resultado similar final.

Las mutaciones heredadas son casi exclusivamente sin sentido (30%) o modifican el patrón de lectura (68%). Pueden ocurrir en cualquier lugar en la primera mitad de la secuencia codificante, pero con puntos calientes muy marcados en los codones 1061 y 1309. *Hits* secundarios somáticos pueden ocurrir por pérdida alélica o por mutaciones puntuales. Las mutaciones somáticas puntuales en los cancer de colon heredados y esporádicos se agrupan en la llamada región de agrupamiento de mutaciones en los codones 1286-1513. Es muy interesante la relación entre las mutaciones germinales y las somáticas. En ambas la posición y el tipo del segundo *hit* dependen de la mutación de la línea germinal. Nada parecido se observa en otros síndromes de cánceres familiares.

La proteína APC tiene tres regiones de unión a ß-catenina y siete módulos de 20 aminoácidos que regulan a la baja los niveles de ß-catenina. La relación entre el primero y segundo *hit* puede resumirse como sigue (Albuquerque *et al.*, 2002):

- Si la mutación de la línea germinal produce una proteína que carece de las siete secuencias reguladoras de ß-catenina, el segundo *hit* somático produce una proteína que tendrá uno u, ocasionalmente, dos de tales módulos.
- Si la mutación de la línea germinal produce una proteína con un módulo, la mutación somática elimina todos, por truncamiento o pérdida alélica.
- En los pacientes en los que la mutación de la línea germinal deja dos módulos, en la mayoría de los tumores el segundo *hit* ha sido una mutación puntual que eliminó todas las regiones.

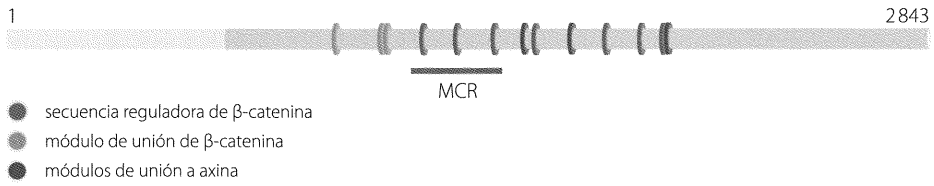


Figura 12.12 – La proteína APC y su papel regulador en los niveles de ß-catenina. La proteína tiene 2843 aminoácidos. Tres módulos de 15 aminoácidos se unen a ß-catenina y siete módulos de 20 aminoácidos regulan a la baja su nivel. APC funciona en un complejo con axina y GSK3 ß. Las mutaciones somáticas están reunidas en la región de agrupamiento de mutaciones (MCR). Debido a la inusual estructura exón-intrón del gen APC, solo las truncaciones en la parte de la proteína sombreada en verde podrían ser eliminadas por degradación mediada sin sentido. La mayoría de las mutaciones producen proteínas APC truncadas que son incapaces de unirse a axina pero pueden unirse todavía a ß-catenina y tener una limitada capacidad de regularla a la baja.

La implicación clara es que hay una selección para la función reguladora del "nivel exacto" de ß-catenina. Quizá la pérdida completa podría producir niveles de ß-catenina que serían lo bastante anormales como para inducir apoptosis en estas células relativamente normales.

Este complejo depende de la inusual estructura del gen APC (*Tabla 12.5*). El extremo largo del exón 3 incluye 6580 pb de la secuencia codificante de 8538 pb. Normalmente, las mutaciones sin sentido y de cambios de patrón de lectura no producirían ninguna de las proteínas truncadas predecibles debido a la degradación mediada sin sentido (*Capítulo 6*). A pesar de todo, los codones prematuros de parada en el último exón del gen, o dentro de 50 nt en el último sitio de corte, están generalmente exentos de la degradación (*Figura 6.3*). La región del agrupamiento de mutaciones y todas las regiones reguladoras y de unión a la ß-catenina están codificadas por el último gran exón. Solo en los codones de parada previos al codón 640 del gen APC podría esperarse que se desencadenara la degradación mediada sin sentido. Las mutaciones en el final 5′ del gen están asociadas con un fenotipo atenuado, con relativamente pocos pólipos. Presumiblemente, estas son realmente mutaciones nulas. De cualquier forma, parece que al menos alguna de las proteínas truncadas se produce, y sus propiedades determinan la ventaja selectiva del segundo *hit*.

Christos Xenakis dio una muestra de sangre, de la que se extrajo el ADN para analizar las mutaciones de APC. El análisis mostró que era heterocigoto para una mutación sin sentido en el codón 1309 del gen APC (p.Glu1309X). Esta es una mutación frecuente en FAP. Es altamente penetrante, ya que los portadores de esta mutación tienen cerca del 100% de riesgo de desarrollar un cáncer de colon si no es tratado. Esta identificación permite analizar a los miembros de la familia con alto riesgo. La madre de Christos, Demi, contactó con varios familiares de su último esposo en Chipre haciéndoles saber el nuevo descubrimiento del alto riesgo en la familia, y dándoles un número de contacto del genetista de Seattle para usarlo con su servicio local de genética si alguno de ellos optaba por el test. Mientras tanto, había que pensar en los dos hijos de Christos. Cada uno tendrá un 50% de riesgo, y podrían necesitar sigmoidoscopias desde los 10 años para controlar el desarrollo de pólipos. Todo esto podría evitarse si el test de ADN muestra que los niños no han heredado la mutación. La cuestión es si hacerles el test ahora o dejarlo para más tarde. Analizarlos ahora significaría que un niño con alto riesgo podría crecer con el conocimiento de que necesita un *screening* de intestino anual sin que pueda evitarlo; posponer el test podría significar que el niño, a la edad de 10 años, estaría más capacitado para entender y consentir este procedimiento.

Esta familia ilustra algunos de los argumentos éticos acerca de los test de ADN en niños. Normalmente, parece impropio hacer un test de susceptibilidad genética a niños; por ejemplo, en el Caso 21, los padres de Hannah Ulmer fueron disuadidos

Tabla 12.5 – **La estructura inusual del gen *APC***

Exón	Tamaño (pb)	Intrón	Tamaño (pb)
1	39	1–2	16947
2	153	2–3	11300
3	85	3–4	778
4	202	4–5	8238
5	109	5–6	5052
6	114	6–7	11542
7	84	7–8	8749
8	105	8–9	14111
9	99	9–10	3372
10	379	10–11	2551
11	96	11–12	5116
12	140	12–13	681
13	78	13–14	849
14	117	14–15	5978
15	215	15–16	2387
16	8686		
Total	**10701**		

El patrón de lectura abierto es de 8538 nt, codificando una proteína de 2843 aminoácidos. La mayoría de las mutaciones en la poliposis del colon son de patrón de lectura o sin sentido, pero solo en los exones 1-15 podría esperarse una degradación mediada sin sentido. Datos de ENSEMBL (Junio 2006).

de analizar a sus otros hijos para saber el estatus de portador de Tay-Sachs. En el presente caso hay beneficios para los niños analizados a la edad de 10 años. Los niños con riesgo del 50% de FAP necesitan vigilancia anual mediante sigmoidoscopia comenzando a esta edad. Es claramente beneficioso para el niño evitar este desagradable procedimiento si puede saberse que no es portador de la mutación familiar. Solo mediante el consentimiento paterno puede hacerse el análisis, pero la buena práctica podría incluir el hecho de discutir el tema con el niño y obtener su consentimiento lo más rápidamente posible.

12.4. Resumen y ampliación

Cáncer de colon hereditario no-polipósico

FAP, la enfermedad de la familia Xenakis (Caso 24) no es la única forma de susceptibilidad hereditaria de cáncer colorectal. Muchas familias muestran una clara historia de herencia dominante de cáncer de colon de comienzo temprano

pero no tienen pólipos. La susceptibilidad mapea al cromosoma 2p22 en algunas familias y al 3p21.3 en otras. Un estudio de pérdida de heterocigosidad en los tumores da la primera pista de los eventos moleculares. Genotipar con marcadores de microsatélites muestra un efecto inesperado: en vez de la pérdida de heterocigosidad en sitios cromosómicos específicos, los investigadores encuentran que el tumor muestra alelos adicionales nuevos en el marcador. Además, el efecto no es específico de un punto cromosómico particular, sino que se han visto con microsatélites a lo largo de todo el genoma.

Los microsatélites son pequeñas extensiones de secuencias repetitivas de ADN, con frecuencia $(CA)_n$ (ver *Capítulo 9*). Cuando la ADN polimerasa replica algunas de estas secuencias es frecuente que cometa errores, poniendo una unidad de repetición extra o dejándola fuera. Tal deslizamiento en la replicación ocurre durante la amplificación de la PCR, y es la causa de bandas extra ("bandas tartamudas") que se observan cuando los microsatélites corren en los geles (ver *Figura 7.15b*). Lo mismo podría pasar durante la replicación celular del ADN, pero *in vivo* los mecanismo de reparación detectan desemparejamientos entre la cadena modelo y la nueva sintetizada, y corrigen el error. La inestabilidad de microsatélites vista en el cáncer de colon hereditario no-polipósico (HNPCC) es el resultado del fallo en la maquinaria de **reparación de apareamiento erróneo (MMR).**

La maquinaria MMR está altamente conservada desde *E. coli* hasta el hombre, y una vía por la que los genes humanos MMR fueron clonados fue buscando homólogos humanos de los llamados "genes mutadores en levaduras". Seis genes están implicados en el proceso en el hombre (*Tabla 12.6*). De estos, las mutaciones en *MSH2* y *MLH1* están en los casos más habituales de HNPCC. Actúan como genes supresores de tumores; una mutación de pérdida de función puede ser heredada, y el alelo restante funcional es inactivado en el tumor por una mutación somática o epigenética (ver a continuación). Los casos esporádicos tienen ambas copias del gen silenciadas somáticamente por mutaciones o metilación del promotor.

¿Por qué podría un defecto en el mecanismo general como el MMR causar específicamente un cáncer de colon? En parte, la respuesta es que puede causar

Tabla 12.6 – Genes implicados en la reparación de apareamiento erróneo

Gen	Número OMIM	Localización	Porcentaje de HNPCC
MSH2	609309	2p22p21	60%
MLH1	609310	3p21.3	30%
MSH6	600678	2p16	5% (atípico)
MLH3	604395	14q24.3	Raro o ausente
PMS1	600258	2q31q33	Raro o ausente
PMS2	600259	7p22	Raro o ausente

Las mutaciones *MSH6(GTBP)* han sido descritas más en mujeres con cáncer endometrial que con cáncer de colon.

otros cánceres. La inestabilidad cromosómica se ha visto en algunas ocasiones en otros tumores, especialmente en tumores gástricos y endometriales. La respuesta podría ser encontrada mirando las consecuencias de los fallos de MMR. La transformación del factor de crecimiento B (TGFß) en un fuerte inhibidor de la proliferación celular en colon y recto. Actúa a través de los receptores de la superficie celular del cual la proteína TGFBR2 (receptor 2 TGFß) es parte. El gen *TGFBR2* contiene una cola de 10 nucleótidos consecutivos de A en el exón 3 de la secuencia codificante (*Figura 12.13*). Las células deficientes MMR son propensas a insertar o saltarse una o más As. Esto produce una nueva copia no-funcional. Un estudio de revisión encontró mutaciones somáticas de *TGFBR2* en 100 tumores de 111 casos de cáncer de colon con inestabilidad de microsatélites. Se han encontrado otras dianas relevantes, esto es, genes con funciones relevantes que contienen secuencias parecidas a microsatélites.

```
743  TGC  ATT  ATG  AAG  GAA  AAA  AAA  AAG  CCT  GGT  GAG  ACT  TTC
120  Cys  Ile  Met  Lys  Glu  Lys  Lys  Lys  Pro  Gly  Glu  Thr  Phe
```

Figura 12.13 – Parte de la secuencia del exón 3 del gen *TGFRB2*.
Una cola de 10 As consecutivas hace la replicación de este gen vulnerable a defectos en la reparación de apareamiento erróneo.

Un efecto similar se ha sugerido en el gen *APC*. Una variante de sentido cambiado, p.Ile1307Lys, se encuentra en el 6% de los judíos ashkenazi, y una proporción mucho más pequeña en otras personas. La variante parece ser un alelo de susceptibilidad de baja penetrancia para el cáncer de colón que, aproximadamente duoplica el riesgo normal. La secuencia de ADN cambia creando una cola ininterrumpida de As (*Figura 12.14*), sugiriendo vulnerabilidad para los defectos de MMR. A pesar de todo, a diferencia con *TGFBR2*, no hay evidencia de que esta cola esté preferentemente mutada en HNPCC, por lo tanto, el efecto de la susceptibilidad podría operar en el nivel de la proteína.

```
GCA  GAA  ATA  AAA  GAA  AAG   →   GCA  GAA  AAA  AAA  GAA  AAG
Ala  Glu  Ile  Lys  Glu  Lys       Ala  Glu  Lys  Lys  Glu  Lys
```

Figura 12.14 – El alelo susceptible de cáncer de colon p.Ile1307Lys del gen *APC*.
Nótese la cola de 8 As creada por la mutación.

El desarrollo multipasos del cáncer

Los patólogos saben desde hace tiempo que el desarrollo de los tumores malignos se realiza en diferentes etapas marcadas por el crecimiento y la desdiferenciación. La FAP ofrece una oportunidad excepcional para estudiar este proceso. Cuando el colon de un paciente con FAP se extirpa quirúrgicamente, suele contener lesiones que muestran todas las etapas del desarrollo del tumor. Vogelstein y sus colegas (resumido en Kinzler y Volgestein, 1996) analizaron series, junto con tumores de colon esporádicos, para estudiar mutaciones en genes candidatos y pérdidas de heterocigosidad. Encontraron algunas alteraciones que estaban presentes frecuentemente en estadios tempranos, y otras que sólo aparecían en estadios tardíos. Juntando sus observaciones, propusieron el esquema de desarrollo mostrado en la *Figura 12.15*.

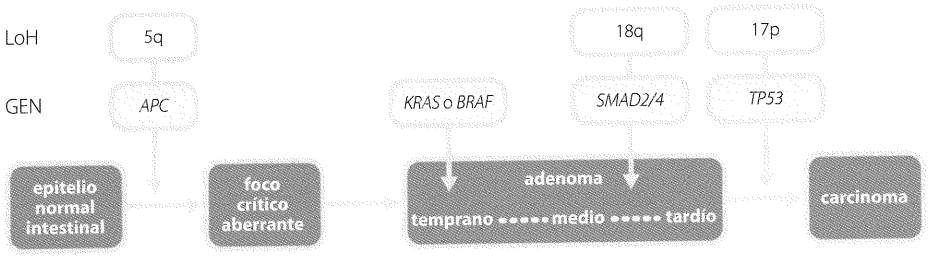


Figura 12.15 – Una posible vía común para el desarrollo del cáncer de colon.
El esquema (véase en Kinzler y Vogelstein, 1996) recoge el modo en el que muchos genes suelen estar inactivados en las lesiones tempranas, mientras que otros lo están solo en las lesiones de las etapas tardías. Ha habido algo de controversia acerca de la aplicabilidad general de este esquema, y no hay indicios de que todos los cánceres de colon se desarrollen exactamente de este modo.

Los estadios más tempranos son los más críticos, porque esas mutaciones deberían causar inestabilidad o una ventaja en el crecimiento en relación con la célula normal que todavía tiene la mayoría de sus defensas intactas. Probablemente hay solo un pequeño número de vías para lograr esto, pero hay un gran número de vías de desarrollo una vez que el estado inicial ha comenzado. Las células con mutaciones en HNPCC pueden tener un amplio rango de posibles caminos de evolución hacia el cáncer, pero la mayoría de los jugadores están implicados. Los tumores que pierden mutaciones en APC tienen frecuentemente mutaciones en otros componentes de la misma vía, por ejemplo, ß-catenina o axina. Los tumores que carecen de mutaciones en *RAS* suelen tener mutaciones en el gen *BRAF*, que tiene funciones similares. Como se mencionó más arriba, la señalización de TGFß es un regulador negativo importante del crecimiento celular en el colon. Dentro de la célula, el receptor TGFß señaliza por fosforilación en residuos serina o treonina en proteínas SMAD. Este camino es alterado habitualmente en el cáncer colorectal, por mutaciones en *TGFBR2* en cánceres con defectos MMR o por pérdidas del cromosoma 18 donde el gen SMAD4 está localizado en cánceres no-HNPCC.

Ampliando este enfoque, Vogelstein consideró el equilibrio entre nacimiento y muerte de células. Dado que en los órganos y tejidos adultos el tamaño permanece constante, debe haber algún mecanismo que regule este. Vogelstein sugiere que en cada tejido hay un gen crítico que lo dirige. Denomina a estos genes "*gatekeepers*". Las mutaciones en los *gatekeepers* específicos de un tejido podrían ser iniciadoras de sucesos cancerosos específicos del tejido. Una vez que el tumor ha comenzado, la progresión dependerá de la habilidad de las células para mantener sus defensas contra el crecimiento desordenado. A los genes responsables de esto los llama "*caretakers*". Así, el tumor se inicia con mutaciones en *gatekeepers* y progresa con otras en *caretakers*. Este cuadro es adecuado para el cáncer colorectal; si es aplicable de forma general es discutible. Al menos, es una buena herramienta para pensar en la carcinogénesis.

Epigenética en cáncer

Como se vio en el *Capítulo 7*, no está claro el papel de los mecanismos epigenéticos en las enfermedades hereditarias. A pesar de todo, no hay discusión acerca de su importancia en el cáncer. Los estudios de metilación de ADN en células tumorales mostraron una situación algo paradójica. Por un lado, el nivel general de metilación está reducido en muchos tumores comparado con sus réplicas normales. Por otro lado, muchas de las islas CpG están hipermetiladas. Alrededor de las mitad de los genes tienen islas CpG asociadas con sus promotores (ver

Capítulo 7). En las células normales estas islas no están metiladas, independientemente de si el gen relacionado está activado o silenciado. La metilación de los promotores (de dinucleótidos CpG aislados) controla la expresión de los genes que pierden las islas CpG, pero no de aquellos con islas. En las células cancerosas, sin embargo, los genes que tienen promotores con islas CpG están con frecuencia silenciados por metilación. Hay alguna evidencia de que los tumores pueden dividirse en aquellos en los que muchas islas están metiladas y aquellos donde esto no ocurre, implicando la existencia de algún mecanismo general que favorece la metilación aberrante de las islas. Se dice que los tumores con metilación extensiva de las islas son clínica y etiológicamente distintos de los que han perdido esta característica.

Los genes ST son silenciados por metilaciones del promotor al menoscon tanta frecuencia como por mutación. La importancia relativa de estas dos rutas varía de gen a gen. Muchos genes se conocen por ser silenciados siempre epigenéticamente y nunca por mutación, mientras que para otros lo contrario es verdad, e incluso para otros son comunes ambos procesos. Por ejemplo, *MLH1* se silencia epigenéticamente de forma habitual, pero *MSH2* nunca. Jones y Baylin (2003) proporcionan una revisión de este tema. Una de sus especulaciones se basa en que la hipometilación de los centrómeros podría predisponer a las células cancerosas a una inestabilidad cromosómica. En parte esto está basado en la observación del síndrome ICF (OMIM 242860), donde la deficiencia de una ADN metiltransferasa *DNMT3B* produce un empaquetamiento aberrante de la heterocromatina centromérica.

¿Son realmente el cáncer de mama familiar y el cáncer de colon familiar enfermedades multifactoriales?

En la familia Wilson (Caso 24), el resultado de un cribado de mutaciones explicó la fuerte historia familiar. Pero muchos multicasos de cáncer de mama familiar no tienen mutaciones en ninguno de los genes *BRCA1/2*. Las mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2* explican alrededor del 25% de la tendencia familiar al cáncer de mama. Continuas investigaciones han fracasado en la búsqueda de algún gen *BRCA3* que podría explicar una porción significativa de los casos restantes. Parece probable que la tendencia familiar restante sea poligénica, producida por la combinación de efectos de muchos loci de baja penetrancia (Antoniou *et al.*, 2002). Se ha establecido un consorcio para analizar los genes candidatos de efectos de baja penetrancia en la susceptibilidad (Nacional Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium, 2005).

Algunos de estos loci han sido identificados. *CHEK2* (OMIN 604373) es un gen implicado en la detección y señalización de daño al ADN. Una deleción de código de lectura, c.1100delC, fue encontrada en el gen *CHEK2* en 201 de 10860 (1,9%) pacientes de cáncer de mama no seleccionados, pero sólo en 64 de 9065 (0,7%) de los controles. Esto dio un riesgo relativo de 2,34. Estos datos sugieren que la variante duplica de cualquier forma el riesgo de una mujer y que puede deberse a otros factores. En general, una mujer portadora de la mutación 1100delC tiene un riesgo de cáncer de mama en su vida de 13,7%, comparado con el 6,1% de las no portadoras. Sin embargo, por sí misma, la variante explica solo

el 0,7% de la incidencia total de cáncer de mama en la población, una cifra menor que muchos factores de estilo de vida como el número de partos, el peso y la actividad física. No está claro bajo qué circunstancias podría ser peor realizar el cribado para la variantes. Otros posibles factores de susceptibilidad de baja penetrancia son variantes en los genes *STK15* y *PTPRJ* (Lesueur *et al.*, 2005). Buscar estos factores de susceptibilidad de baja penetrancia y decide que hacer cuando se encuentran nos introduce dentro del área de susceptibilidad de enfermedades multifactoriales comunes, que es el tema del capítulo siguiente.

Una situación similar se ha visto en el cáncer de colon. El riesgo a lo largo de la vida es de 5-6% en Estados Unidos. Alrededor del 20% de los pacientes de cáncer colorrectal tienen dos o más familiares de primer o segundo grado con cáncer de colon; el 5-10% de los casos muestran más o menos herencia mendeliana. FAP y HNPCC dan cuenta del 4% de todos los cánceres de colon; el resto de la tendencia familiar es probablemente el efecto de muchos alelos.

Perfil de expresión de los tumores

Muchos tumores son genéticamente únicos. Como Hanahan y Weinberg (2000) muestran, hay muchos caminos diferentes de conseguir las seis capacidades vistas en el *Cuadro 12.1*. En una vía, diferentes genes pueden ser activados o inactivados por mutaciones puntuales, cambios epigenéticos o sucesos cromosómicos. Muchos de los productos de estos genes son multifuncionales y, además del efecto que es la diana de la selección natural, podría haber otros tipos de efectos secundarios. Los tumores evolucionan en un mar de células genéticamente inestables albergando una diversidad de mutaciones relevantes y secundarias. La verdadera diana para la terapia debería ser la pequeña minoría de células cancerosas en un tumor que tienen propiedades de células madre. Para un médico que intenta decidir el óptimo manejo y pronóstico de un paciente, hay una gran necesidad de definir una pequeña lista de los cambios relevantes. En Jason Tierney (Caso 20) identificar la fusión *TEL-AML1* dio esta información. En los pacientes de cáncer de mama, buscar la amplificación de los receptores de *HER* es un comienzo, ya que estos definen la respuesta a Herceptina.

El perfil de expresión de los tumores nos proporciona la esperanza de realizarlo. La totalidad del ARN o del ADNc de un tumor se marca con un color y se hibrida a un microarray, para compararlo en un ensayo competitivo con el repertorio de ARNm en un tejido normal relevante. El microarray lleva los oligonucleótidos correspondientes a las regiones únicas de ADNc de cada gen en todo el genoma, y prácticamente todas las variantes importantes de corte. El Centro de Aprendizaje de Ciencia Genética de la Universidad de Utah (ver *Referencias*) tiene una página web animada muy interesante que explica desde el principio el análisis de expresión de lo arrays en el cáncer. Estos experimentos generan gran cantidad de datos. El investigador tiene que intentar extraer una "firma" o patrón de expresión de un número limitado de genes que defina el pronóstico y la respuesta del tumor a medicamentos anticancerosos. La *Figura 12.16* muestra un ejemplo del patrón de expresión. Un editorial que posiciona este trabajo en un contexto más amplio está disponible (Hedenfalk, 2002).

El análisis estadístico mediante agrupamiento jerárquico, como en la *Figura 12.16*, permite que sea extraído el patrón que en muchos casos ha mostrado ser pre-

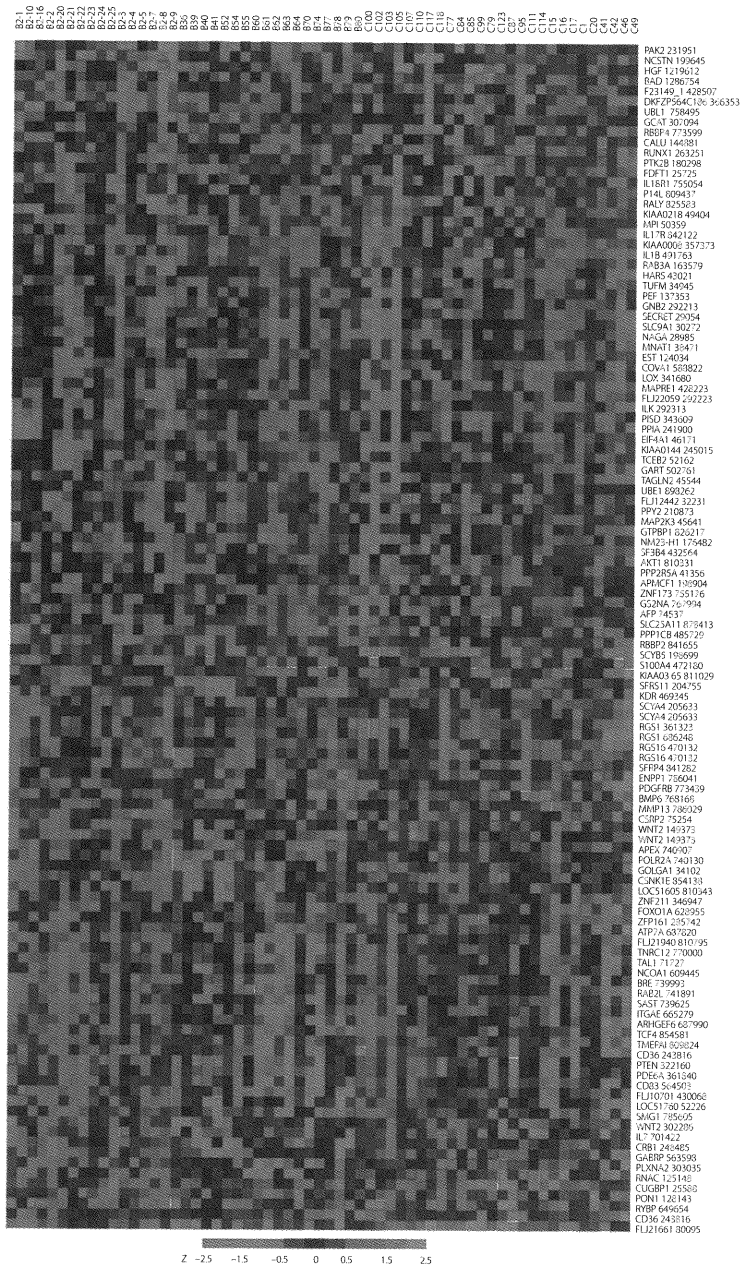


Figura 12.16 – Perfil de expresión de tumores de ovario. Esto no es una fotografía de un microarray; es una tabla grande que muestra el patrón de expresión de 110 genes seleccionados de un microarray de 7651 genes en 61 tumores de ovario. Cada columna es el dato de un tumor y cada fila es el dato de un gen. Los niveles de expresión tienen un código de color (verde=expresión significativamente reducida; rojo=expresión significativamente aumentada). Los resultados se agrupan mediante análisis estadísticos, de forma que revelen un patrón común: 18 de los tumores tienen mutaciones en *BRCA1*, 16 tenían mutaciones en *BRCA2* y 27 no tenían ninguna ("esporádicos"). Los perfiles de expresión distinguen los patrones de *BRCA1* y *BRCA2*, y muestran que diferentes tumores esporádicos se ajustan a uno u otro de estos dos patrones. Evidentemente, las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* causan cáncer de ovario por diferentes rutas, y los tumores esporádicos siguen uno u otro de estos caminos. Reproducido de Jazaeri *et al.* (2002) con permiso de Oxford University Press.

dictivo para la respuesta a terapia o al pronóstico (ver, por ejemplo, Glinsky *et al.*, 2005). Queda por ver si estos patrones pueden ser trasladados a herramientas clínicas útiles. Hay dos problemas que solventar. El primero es que un único experimento de microarray produce un vasto volumen de datos que podrían ser analizados de muchas maneras. Esto hace complicado conocer el significado de algunos patrones recogidos. El segundo problema es muy común, trasladar el conocimiento a la práctica clínica. Un test puede discriminar eficazmente entre dos grupos, pero no significa necesariamente que se pueda asignar con exactitud un tumor individual al grupo apropiado. Algunos patrones de expre-

sión permiten una predicción estadística, y pueden distinguir entre grupos de tumores con buen pronóstico de los que tienen mal pronóstico; la pregunta es si son suficientemente específicos para dar una predicción útil en un paciente individual. Algunos investigadores piensan que es más rentable estudiar el repertorio de proteínas totales de un tumor usando la tecnología de la proteómica (electroforesis bidimensional de 2 geles, espectrometría de masas, etc.).

Cuadro de enfermedad 12

Enfermedad de von Hippel–Lindau

Los pacientes con la enfermedad de von Hippel-Lindau (OMIN 193300) tienen un alto riesgo de desarrollar una variedad de tumores (*Tabla1*). Las causas más frecuentes de muerte son el carcinoma de células renales o los hemangioblastomas en el sistema nervioso central. La enfermedad es autosómica dominante con una incidencia de 1 en 35.000-45.000. El 95% de los portadores del gen han desarrollado una o más características tumorales a la edad de 65. Debido a las diferentes manifestaciones de la enfermedad, se puede tratar por diferentes especialistas clínicos, la conexión entre ellos no se hace siempre de un modo adecuado, lo que provoca un retraso en el establecimiento del diagnóstico. El genetista clínico debería coordinarlo todo.

Tabla 1 – Los pacientes con enfermedad de von Hippel-Lindau pueden desarrollar una variedad de tumores y requieren un seguimiento cuidadoso

Tumor	Frecuencia	Edad de presentación	*Screening*	Edad para el *screening*
Hemangioblastoma CNS	60–80%	33 años	RMI craneoespinal anual	11 años
Hemangioblastomas de retina	60%	25 años	Oftalmoscopia anual	Infancia
Tumor del saco endolinfático	11%	22 años	TAC o RMI	Cuando los síntomas aparecen
Carcinoma renal	24–45%	39 años	TAC de abdomen anual	18 años
Feocromocitoma	10–20%	30 años	Catecolamina plasmática anual o en orina de 24 h	2 años

Datos procedentes de Lonser *et al.* (2003).

El locus *VHL* fue mapeado en 3p25-26 y el gen fue identificado por clonación posicional. Se comporta como un clásico gen ST. Los pacientes heredan una mutación de pérdida de función y en sus tumores inactivan la segunda copia por mutación, deleción o metilación. El 70-80% de los carcinomas renales esporádicos de células claras muestran una inactivación de ambas copias. El gen es pequeño (3 exones codifican una proteína de 213 aminoácidos) y la detección es sencilla.

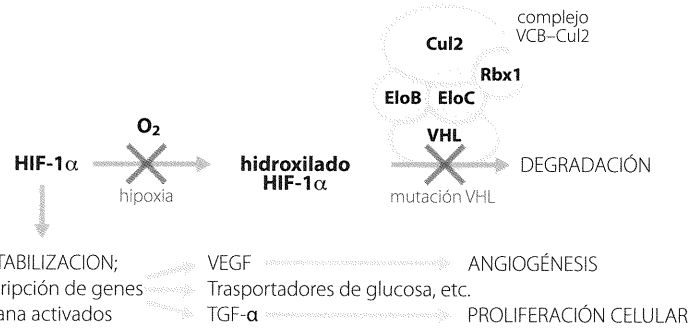
La expresión de la enfermedad varía entre familias (*Tabla 2*). En algunas familias las personas afectadas nunca parece que desarrollen feocromocitomas, mientras que en otras son frecuentes. Esto ha conducido a dividir la enfermedad en dos tipos Tipo: 1 y 2. El Tipo 2 ha sido, además, subdividido en 2A, 2B y 2 C. Todas las formas están causadas por mutaciones en el gen *VHL*. Se ha establecido una débil correlación genotipo-fenotipo: normalmente las deleciones y mutaciones de truncamiento causan el Tipo1, mientras que las familias del Tipo 2 normalmente tienen mutaciones de sentido cambiado. Estas están asociadas particularmente con diferenes subtipos del Tipo 2. El carcinoma de células renales es más frecuente en las familias del Tipo 1 que en las del Tipo 2.

Tabla 2 – Los subtipos clínicos de la enfermedad de von Hippel-Lindau tienden a reproducirse en las familias.

Tipo	Feo.	RCC	Hem.
1	–	+	+
2A	+	–	+
2B	+	+	+
2C	+	–	–

Feo, feocromocitoma; RCC carcinoma de células renales; Hem, hemangioblastoma.

Las investigaciones se han focalizado en la relación de la proteína VHL con la proteína HIF-1α (factor 1α inducible por hipoxia). La proteína VHL es parte del complejo ligasa ubiquitina E3 (VCB-Cul 2) que controla el nivel de HIF-1α por degradación, cuando los niveles de oxigeno son normales (*Figura*). HIF-1α está marcada para degradación por la hidroxilación de un residuo específico de prolina en una reacción dependiente de oxígeno. La proteína VHL actúa como el componente de reconocimiento de la ubiquitina ligasa: directamente une HIF-1α hidroxilada. Las mutaciones patogénicas VHL de sentido cambiado se agrupan en la región de unión de HIF-1α de la proteína. Bajo condiciones de hipoxia, HIF-1α se estabiliza. Entonces actúa como un activador de la trascripción multifuncional. Entre sus muchas dianas están VEGH (factor de crecimiento vascular endotelial), un poderoso promotor de la angiogénesis. Los tumores en la enfermedad de von Hippel-Lindau están muy vascularizados. Otras dianas de HIF-1α son el factor de crecimiento TGFα y las enzimas promotoras de la glicolisis y el transporte de glucosa.



El factor 1α inducible por hipoxia causa un ajuste importante en el metabolismo de la célula en respuesta a hipoxia.
Cul2, cullina-2; EloB, elongina B; EloC, elongina C; Rbx1, proteína reguladora de cullina. En células VHL, el HIF está activa constitucionalmente.

La proteína VHL parece tener otras funciones independientes de Hif-1α (Barry y Kreck, 2004). Aunque esta proteína es mucho más pequeña que los gigantes andamiajes de proteínas codificados por otros genes supresores de tumores (ver a continuación), se han identificado un sorprendente número de posibles ligandos. La proteína VHL se une a la ciclina D1 conduciendo a posibles efectos en el ciclo celular. Los efectos en la matriz extracelular, vía uniones a fibronectina, y en el citoesqueleto, vía asociaciones a los microtúbulos, puede ser significativo en la invasión y en la metástasis. Además, se ha visto que la proteína VHL se une a p53 y se estabiliza frente a la degradación mediada MDM2.

12.5. Referencias

Albuquerque C, Breukel C, van der Luijt R, *et al.* (2002) The 'just right' signaling model: *APC* somatic mutations are selected based on a specific level of activation of the β-catenin signaling cascade. *Hum. Molec. Genet.* 11: 1549–1560.

Antoniou AC, Pharoah PDP, McMullen G, *et al.* (2002) A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. *Br. J. Cancer,* 86: 76–83.

Barry RE y Krek W (2004) The von Hippel–Lindau tumor suppressor: a multi-faceted inhibitor of tumorigenesis. *Trends Mol. Med.* 10: 466–472.

Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, *et al.* (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature,* 305: 779–784.

Evans DGR, Eccles DM, Rahman N, *et al.* (2004) A new scoring system for identifying a *BRCA1/2* mutation outperforms existing models including BRCAPRO. *J. Med. Genet.* 41: 474–480.

Glinsky GV, Berezovska O y Glinskii AB (2005) Microarray analysis identified a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J. Clin. Invest.* 115: 1503–1521.

Hanahan D y Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell, 100*:57-70. *Los lectores que no dominen la biología celular deberán elucir los detalles, pero es una excelente introducción a una visión moderna del cáncer.*

Hedenfalk IA (2002) Gene expression profiling of hereditary and sporadic ovarian cancers reveals unique *BRCA1* and *BRCA2* signatures. *J. Natl. Cancer Inst.* 94: 960–961. *Texto entero libre en* http://jncicancerspectrum.oxfordjournals.org/cgi/content/full/jnci;94/13/960

Jazaeri AA, Yee CJ, Sotiriou C, *et al.* (2002) Gene expression profiles of *BRCA1*-linked, *BRCA2*-linked, and sporadic ovarian cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 94: 990–1000.

Jones PA y Baylin SB (2003) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Rev. Cancer,* 3: 415–428.

Kinzler KW y Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell,* 87: 159–170.

Lesueur F, Pharoah PD, Laing S, *et al.* (2005) Allelic association of the human homologue of the mouse modifier *Ptprj* with breast cancer. *Hum. Molec. Genet.* 14: 2349–2356.

Lonser RR, Glenn GM, McClellan W, *et al.* (2003) Von Hippel–Lindau disease. *Lancet,* 361: 2059–2067.

National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium (2005) A candidate gene approach to searching for low-penetrance breast and prostate cancer genes. *Nature Rev. Cancer,* 5: 977–985.

Pardal R, Clarke MF y Morrison SJ (2003) Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature Rev. Cancer*, 3: 895–902.

Páginas web útiles

Recursos educativos del Cancer Genome Anatomy Project: http://cgap.nci.nih.gov/info/EducationResources

Centro de aprendizaje genético de la Universidad de Utah, sección de expresión y análisis del cáncer: http://gslc.genetics.utah.edu/units/biotech/microarray/

12.6. Ejercicios de autoevaluación

(1) En relación con la tumorigénesis, para cada una de las siguientes afirmaciones, decida si es:
- (a) cierto en ambos oncogenes y genes supresores de tumores
- (b) cierto en oncogenes pero no en genes supresores de tumores
- (c) cierto en genes supresores de tumores pero no en oncogenes
- (d) no es cierto en ningún gen supresor de tumores ni en oncogenes

(1) Pueden aparecer mutaciones sin sentido en cánceres esporádicos
(2) Puede codificar proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular
(3) Mutan frecuentemente en familias y en cánceres esporádicos
(4) Implicados con frecuencia en la pérdida de heterocigosidad en cánceres esporádicos
(5) Mutan frecuentemente en cánceres familiares pero no en esporádicos
(6) Pueden inactivar las telomerasas indirectamente
(7) Suelen implicar reordenamientos cromosómicos en cánceres esporádicos
(8) Pueden aparecer mutaciones de sentido cambiado heredadas en cánceres familiares
(9) Frecuentemente mutados en cánceres esporádicos pero no en familiares
(10) Puede mostrar amplificación de genes en cánceres familiares y esporádicos

(2) Se extrajo la sangre y el ADN de un tumor de dos niños no relacionados con la retinoblastoma y se tipó para 2 alelos marcadores de ADN mapeados cerca del gen *RB1*. Un niño tiene una historia familiar de retinoblastoma, mientras que el otro tiene un tumor unilateral esporádico. Los genotipos fueron:

	Niño A	**Niño B**
Sangre	Heterocigoto 2–1	Homocigoto para alelo 1
Tumor	Heterocigoto para alelo 2	Homocigoto para alelo 1

Marque cada una de las siguientes afirmaciones como verdadera o falsa:
- (a) El resultado indica que el Niño B tiene la forma esporádica de la enfermedad
- (b) El resultado indica que el Niño A tienen la forma familiar de la enfermedad

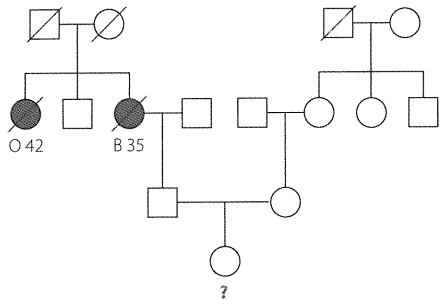
(c) El resultado indica que el tumor en el Niño B podría ser homocigoto o hemicigoto para el marcador

(d) El resultado indica que si el Niño A tiene la forma heredada de la enfermedad, la heredó en el cromosoma que tiene el alelo 2 del marcador

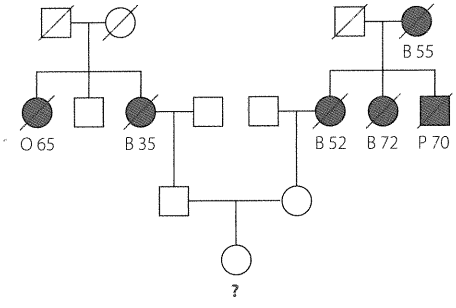
(3) La neurofibromatosis 2 (OMIM 101000) es el resultado de heredar y/o tener una mutación somática en el gen supresor de tumores *NF2*. La NF2 heredada muestra una penetrancia del 90%. Asumiendo una tasa de mutación de 2×10^{-4} por gen y por célula, ¿cuál es el tamaño de la población celular diana?, ¿cuál es la incidencia esperada de NF2 esporádica?

(4) La figura muestra dos familias en las que hay muchos casos de cáncer (B, mama; O, ovario; P, próstata; los números son la edad al diagnóstico). ¿Cuál de las dos mujeres marcadas con un interrogante priorizarías para un *screening* de mutación *BRCA1/2*?

(a)



(b)



Capítulo **13**

¿Debería analizarse la susceptibilidad genética a enfermedades comunes?

Conceptos y habilidades que aprenderás en este capítulo

Después de estudiar este capítulo será capaz de:

- Describir cómo los genes modificadores, y los efectos estocásticos y pleiotrópicos, dan lugar a una expresividad variable y a una penetrancia incompleta, incluso en las enfermedades mendelianas.
- Describir cómo los genes interactúan con otros genes y con varios factores ambientales para producir fenotipos que incluyen enfermedades.
- Describir la naturaleza multifactorial de la mayoría de los rasgos humanos, normales y anormales, y los principios de la herencia multifactorial.
- Explicar los loci de rasgos cuantitativos.
- Describir la teoría del umbral de Falconer y utilizarla para hacer predicciones cualitativas de riesgo.
- Describir el principio del análisis de parejas de hermanos afectos.
- Definir y comparar el vínculo y la asociación entre un marcador y una enfermedad.
- Describir y explicar la estructura en bloque del haplotipo del genoma humano.
- Describir los problemas y posibilidades de identificar factores de susceptibilidad mediante estudios de asociación.

13.1. Historias clínicas

CASO 25 | Familia Yamamoto | **329** | 341 | 376

- Historia familiar de demencia
- ? Enfermedad de Alzheimer
- ¿Análisis para ApoE4?

La madre de Bill Yamamoto se ha ido volviendo olvidadiza. Tras una serie de incidentes, incluyendo uno en el que dejó una sartén en la cocina encendida y la habitación ardió, se hizo patente que no podía vivir sola. Se mudó a un alojamiento asistido en la misma ciudad californiana en la que viven Bill y su mujer. Nunca se adaptó a su nuevo entorno y pronto requirió cuidados en una residencia.

En los tres años siguientes su demencia progresó, hasta que rara vez reconocía a Bill y era incapaz de hacer nada por sí misma. Casi fue un alivio que muriera a los 71 años. Como dijo Bill, "mi verdadera madre murió hace varios años".

Cuando un amigo de su mujer comentó que la enfermedad de Alzheimer era hereditaria, Bill empezó a preocuparse. Sabía que su tía Yumiko, la hermana de su madre que siempre había vivido en el viejo hogar familiar de Hawai, había

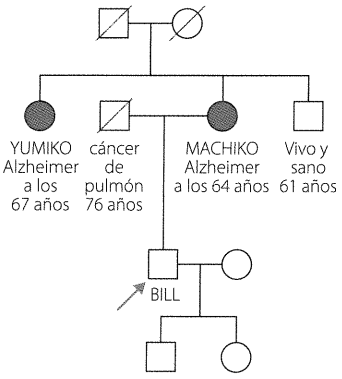


Figura 13.1 – Árbol genealógico de la familia Yamamoto.

sido diagnosticada de Alzheimer con 67 años. Su mujer le aconsejó que fuera a hablar con su médico. Este le dijo que solo las formas raras de la enfermedad con un comienzo posterior a los 60 años de edad eran heredadas. Bill todavía no estaba totalmente tranquilo.

Buscando en internet, descubrió que un factor genético, ApoE4, estaba asociado a susceptibilidad a formas comunes de comienzo tardío de la enfermedad, y buscó compañías que ofrecieran el análisis para ApoE4. Se preguntó si debería hacerse el test, y decidió consultar a un genetista. Quiso saber si el test era fiable para alguien con ancestros japoneses como él, y qué debería hacer si el resultado era positivo.

CASO 26 — Familia Zuabi **330** 345 376

- Zafira, mujer de 52 años
- Sobrepeso; estilo de vida sedentario; sed insaciable
- Diabetes tipo 2
- Análisis para su hijo

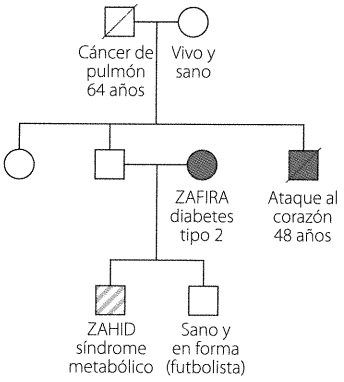


Figura 13.2 – Árbol genealógico de la familia Zuabi.

Zafira tenía 52 años cuando acudió a su médico por una historia de tres meses de mareos, dolor de cabeza y visión borrosa. También mencionó que tenía una sed terrible que le llevaba a beber grandes cantidades de agua cada día, produciéndole la correspondiente gran cantidad de orina. Se encontró azúcar en su orina, y un análisis de glucosa en ayunas mostró un nivel de 9 mmol/l. Esto confirmó el diagnóstico de diabetes tipo 2 (T2D). Se le dio tiazolidinediona como primera línea de tratamiento. Llevaba una vida totalmente sedentaria y su índice de masa corporal (BMI) era 30; ingresó en un programa de ejercicio moderado. El ejercicio y la pérdida de peso minimizan la morbilidad en la T2D.

La conmoción por su diagnóstico hizo a Zafira pensar en su familia. Su hermano había muerto de un ataque al corazón a los 48 años. Había tenido sobrepeso y era completamente inactivo, aunque ella no recordaba especialmente que bebiera grandes cantidades de agua. Cuando supo que los parientes de primer grado de los pacientes de T2D tenían un alto riesgo de desarrollar la enfermedad (su médico calculó el riesgo en un 38% para un hijo de un padre afecto), sus pensamientos se centraron en su hijo mayor Zahid. Este no tenía la enfermedad, pero compartía varios factores de riesgo. Iba al trabajo en coche, subía en ascensor a la oficina, pasaba el día sentado en su despacho, disfrutaba de la buena comida y además pasaba la tarde viendo la televisión. No es de extrañar que tuviera sobrepeso. Estuvo de acuerdo en hacerse algunos análisis, los cuales mostraron que su BMI era 30 con una medida de cintura de 99 cm. Su nivel de glucosa en plasma en ayunas fue de 6,4 mmol/l, por debajo del umbral para la T2D que es 7,0, pero por encima de lo normal. Era hipertenso (presión sanguínea de 142/90 mmHg) y tenía dislipemia (triglicéridos 1,9 mmol/l). Su combinación de obesidad, defecto en la tolerancia a la glucosa, dislipemia e hipertensión lo hacen candidato al "síndrome metabólico" (*Tabla 13.1*). Esto define un precursor de T2D y un factor de riesgo principal de enfermedad cardiovascular (revisado por Eckel *et al.*, 2005). Se le prescribió ejercicio y tratamiento antihipertensivo.

Tabla 13.1 – Definición del síndrome metabólico de la OMS (1999)

Característica	Medida
Diabetes	Glucosa en ayunas > 7,0 mmol/l
O defecto de la glucosa en ayunas	Glucosa en ayunas 6,1–7,0 mmol/l
O defecto de tolerancia a la glucosa	
O resistencia a la insulina	Hiperinsulinemia
Dos o más:	
Obesidad	BMI > 30 o ratio cintura-cadera >0,9 (hombre) o 0,85 (mujer) (otras cifras para personas que no sean blancas)
Dislipemia	Triglicéridos ⩾1,7 mmol/l o HDL colesterol (hombre) <0,9 o (mujer) 1,0 mmol/l
Hipertensión	>140/90 mm Hg
Microalbuminuria	Excreción de albumina >20 µg/min

Algunos organismos muestran algo diferente, pero solapan las definiciones. La lista muestra la compleja interacción de los caracteres que indican susceptibilidad a la diabetes tipo 2 y a la enfermedad cardiovascular. La prevalencia del riesgo aumenta con la edad, entre los adultos de Estados Unidos desde el 7% a los 20–29 hasta el 44% a los 60–69. La prevalencia es del 50% en jóvenes de ese país gravemente obesos y está incrementada en todas las edades y en la mayoría de países.

13.2. Antecedentes

Dos modelos de determinación genética

Tradicionalmente, los caracteres genéticos se han dividido en mendelianos y **poligénicos.** Las enfermedades poligénicas dependen de la acción combinada de un gran número de factores genéticos. Ambas categorías, mendeliana y poligénica, son modelos conceptuales, herramientas útiles para pensar sobre la herencia, pero en realidad todas las enfermedades se encuentran en algún lugar entre las dos. Para cualquier carácter en particular, se necesita decidir qué mezcla de los dos modelos conceptuales da la mejor descripción y entonces añadir los efectos ambientales. La *Figura 1.15* muestra un espectro lineal de fenotipos genéticos. Añadiendo los efectos ambientales, el conjunto de la etiología de cualquier enfermedad podría estar representada por un punto en cualquier parte del interior del triángulo de la *Figura 13.3*. "Multifactorial" o "compleja" son términos útiles para enfermedades del interior del triángulo.

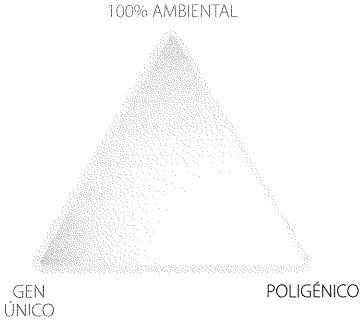


Figura 13.3 – Etiología de las enfermedades. Para cualquier enfermedad, el equilibrio entre genética y determinantes ambientales puede ser representado con un punto en cualquier lugar dentro del triángulo.

Los *genes* son siempre mendelianos, pero los *caracteres* nunca son totalmente dependientes del genotipo de un único locus. Un conocimiento cercano de cualquier enfermedad mendeliana revela que estas enfermedades "simples" no son en realidad tan simples. Como se describe en los *Capítulos 6* y *8*, la búsqueda de la correlación genotipo-fenotipo rara vez produce el resultado nítido deseado. El largo camino entre una variante en la secuencia de ADN y un fenotipo observable permite que muchos jugadores adicionales, ambientales, genéticos y casuales se unan a la acción. El concepto de *penetrancia* permite juntar todos estos factores. Los genes identificados que influyen en la expresión de un carácter básicamente mendeliano se denominan **genes modificadores.**

Dicotomía *versus* caracteres cuantitativos

Se pueden dividir todos los caracteres humanos en dos clases:

- Caracteres dicotómicos o discontinuos, como enfermedades y malformaciones.
- Caracteres continuos o cuantitativos, que todo el mundo tiene en diferentes grados: peso, talla presión sanguínea...

Los caracteres de ambas clases pueden estar determinados genéticamente, aunque los caracteres continuos pueden no ser mendelianos. Los loci de los genes implicados en la determinación de los caracteres continuos se denominan **loci de rasgos cuantitativos (QTL).** La disciplina de los QTL ha sido desarrollada principalmente por genetistas de animales y plantas tratando de mejorar caracteres continuos como la producción de leche o maíz. Algunos QTL pueden ser el resultado de las mismas mutaciones simples de pérdida o ganancia de función. Sin embargo, en muchos casos las variantes de QTL producen fundamentalmente efectos sutiles en la función del gen. Las variantes en promotores u otros elementos de control podrían dar lugar a pequeños cambios en el nivel de expresión. Los cambios en la secuencia podrían alterar ligeramente la estabilidad del mARN o el equilibrio de las isoformas debidas al *splicing*. La variante del gen de la lactasa responsable de la persistencia de la lactasa intestinal (ver *Cuadro 8.4*) es un ejemplo típico. El mismo gen puede causar una enfermedad mendeliana si en él se produce una mutación con un efecto principal, y actuar como un QTL con cambios más sutiles.

Teoría poligénica

Los modelos de herencia poligénica consideran los caracteres que dependen de la acción combinada de un gran número de factores genéticos. El uso principal de estos modelos en genética humana no es hacer predicciones, sino proporcionar un marco para pensar sobre las enfermedades genéticas complejas. Para cualquier enfermedad real el marco necesita ser poblado por datos empíricos epidemiológicos. Los dos elementos del marco más relevantes para la genética clínica son los conceptos de **heredabilidad y umbral,** como se describe más abajo.

La *heredabilidad* se estima comparando la incidencia de un carácter en los parientes de personas afectas con la incidencia en la población general. Para los caracteres continuos se calcula a partir de la correlación entre los parientes. Es un número entre 0 (sin implicación genética) y 1 o 100% (sin factores no genéticos). La heredabilidad se simboliza como h^2, reflejando su origen en la teoría poligénica como un coeficiente de correlación. El coeficiente de heredabilidad es a menudo incomprendido, dando lugar a veces a su mal uso en discusiones políticas sobre si tratar o no de prevenir una enfermedad mediante una acción social. Mientras sus limitaciones son entendidas, la heredabilidad es una medida útil para los investigadores que estudian una enfermedad compleja porque da lugar a una guía de la relevancia de los factores genéticos.

La heredabilidad de una enfermedad no es una medida de cómo se produce la enfermedad fisiológica o bioquímicamente en una persona. De hecho, no está establecida para los individuos, sino para una población. Matemáticamente es la proporción de la varianza fenotípica que es atribuible a la varianza genética. La

pregunta a la que responde la heredabilidad es ¿cuánto de las diferencias entre las personas, en esta sociedad y tiempo concretos, son resultado de las diferencias genéticas entre ellos? y ¿cuánto es resultado de las diferencias del ambiente de las personas?

La heredabilidad no es una propiedad fija de una enfermedad. Si una enfermedad está afectada por factores genéticos y ambientales, su heredabilidad será más elevada si la mayoría de los miembros de la población comparten una exposición relativamente uniforme a los factores ambientales relevantes. Por ejemplo, una enfermedad genética parcialmente que también está asociada con la pobreza y la deprivación social tendrá una heredabilidad mayor en una sociedad igualitaria que en una con grandes diferencias. Factores ambientales nuevos pueden cambiar la heredabilidad. Por ejemplo, hace 100 años el retraso mental de la fenilcetonuria estaba totalmente determinado por la genética. Actualmente, en las sociedades donde el cribado neonatal y el tratamiento dietético es posible, sus causas son casi totalmente ambientales: pérdida de muestras, una familia que no pudo ser encontrada o incapacidad para que un niño homocigoto siga rígidamente la dieta. Estos ejemplos subrayan el hecho de que la heredabilidad es una propiedad de un carácter en un lugar y tiempo determinados.

El *umbral* es un concepto utilizado para explicar cómo los caracteres dicotómicos pueden ser poligénicos. En su forma más simple, la teoría poligénica se aplica sólo a caracteres cuantitativos variables que muestran una distribución de Gauss en la población. El genetista D.S. Falconer utilizaba el concepto de umbral para mostrar cómo la teoría poligénica podría ser extendida a los caracteres dicotómicos (*Cuadro 13.1*). En genética clínica, pensar en el umbral ayuda a comprender el riesgo para las enfermedades complejas, a diferencia de los riesgos de las enfermedades mendelianas, dependiendo de la historia familiar.

Investigar la genética de las enfermedades complejas

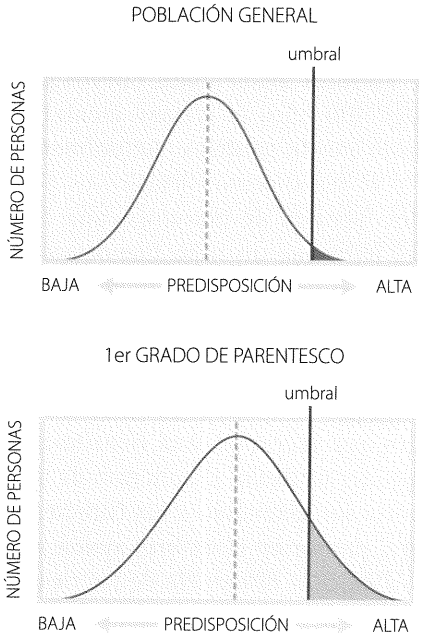
Reivindicar factores genéticos en una enfermedad compleja necesita ser respaldado por la evidencia. Esto proviene normalmente de tres tipos de estudio:

- Los *estudios familiares* consideran a los parientes de los probandus afectos y preguntan qué probabilidad tienen de ser afectos comparados con una persona no relacionada. La razón del riesgo se simboliza como λ, con un subíndice que denota la relación. Por ejemplo, λ_s es el riesgo relativo para un hermano del probandus (*Tabla 13.2*). Valores de λ elevados sugieren factores genéticos, pero es importante recordar que el mismo efecto podría ser producido por el ambiente compartido por la familia, ya que damos a nuestros hijos tanto su ambiente como sus genes.
- Los *estudios de adopciones* separan los efectos de los genes y el ambiente familiar. Por ejemplo, los hijos de padres esquizofrénicos que fueron adoptados al nacer por familias no afectas tienen un riesgo significativamente mayor de desarrollar esquizofrenia, comparado con sus hermanos adoptivos. Esto sugiere que la tendencia familiar a la esquizofrenia es debida a factores genéticos más que al comportamiento parental.
- Los *estudios de gemelos* consideran a personas afectas que tienen un gemelo. Comparan gemelos monocigóticos (MZ) y dicigóticos (DZ) para

Cuadro 13.1

Susceptibilidad poligénica a una enfermedad

Aunque las enfermedades son rasgos dicotómicos, la teoría del umbral postula que la susceptibilidad a la enfermedad es un carácter continuo. La susceptibilidad es un carácter cuantitativo que depende de la combinación de pequeños efectos de muchos genes. Muestra una distribución en forma de campana en la población. La mayoría de las personas tienen una susceptibilidad media; unos pocos tienen una gran susceptibilidad y otros pocos la tienen muy baja. Solo las personas cuya susceptibilidad excede un cierto umbral desarrollan la enfermedad.



Distribución de la susceptibilidad en la población general (parte alta). Distribución en parientes (parte baja).

Si tiene un pariente afecto, esa persona debe tener una susceptibilidad genética alta. Tienen una "baza mala" de genes de alta susceptibilidad y usted comparte genes con él (ver *Cuadro 10.3*). Puede tener suerte y compartir solo unos pocos de los genes de alta susceptibilidad, o compartir muchos. En conjunto, habrá una amplia distribución de susceptibilidad entre los parientes de las personas afectas, pero la curva se desplazará hacia el lado de la alta susceptibilidad comparada con la distribución en la población general (ver la parte baja de la figura). Los parientes de las personas afectas tienen más probabilidad que las personas no relacionadas de ir por encima del umbral. Cuanto más cercano sea el parentesco, mayor probabilidad. Por lo tanto, las enfermedades complejas tienden a desarrollarse en las familias, pero la tendencia es mas débil que en las enfermedades mendelianas (*Tabla 13.2*).

La idea se puede ampliar en varias direcciones.

- Teniendo en cuenta a los factores ambientales, podríamos suponer que, en vez de un umbral único fijo, habrá un riesgo incrementado de desarrollar la enfermedad a través de algunos rangos de alta susceptibilidad.
- Los umbrales pueden ser específicos de género. El ejemplo clásico es la estenosis pilórica. Esta es más común en niños que en niñas (5M : 1F). El umbral debe ser más bajo en niños que en niñas por alguna razón fisiológica. Para ser afecta, una niña tiene que tener una susceptibilidad particularmente alta. Por término medio, las niñas afectas tienen genes de mayor susceptibilidad que los niños afectos. Así, los parientes de las niñas afectas tienen más riesgo de estenosis pilórica que los parientes de niños afectos.

Aunque estos modelos se pueden desarrollar matemáticamente, son útiles como herramientas cualitativas para pensar en los riesgos de recurrencia. Llevan a la siguiente regla general:

Cuadro 13.1 - *Cont.*

En las enfermedades complejas, cuanto mayor sea la mala suerte que una familia ha podido tener en el pasado (muchas personas afectas; el género menos afectado), mayor será el riesgo de recurrencia.

Observe el contraste total entre las enfermedades complejas y mendelianas a este respecto. Si por mala suerte tiene tres hijos, todos con fibrosis quística, el riesgo de que su próximo niño sea afecto sigue siendo 1 por cada 4. Pero si tiene dos niños en vez de uno con defecto de tubo neural, el riesgo para el siguiente hijo pasa de 1 por cada 25 a 1 por cada 12. Tener un segundo hijo afecto no cambia su riesgo, pero sí nuestro conocimiento del riesgo que siempre ha tenido.

Tabla 13.2 – Ejemplos del riesgo de recurrencia de enfermedades mendelianas y multifactoriales.

Enfermedad	λ_s	Riesgos durante la vida (hasta los 80)
Fibrosis quística	500	0,05%
Enfermedad de Huntington	5000	0,01%
Enfermedad celíaca	60	3%
Esclerosis múltiple	25	1%
Diabetes tipo 1	15	6%
Diabetes tipo 2	4–6	7–35%
Cáncer testicular	8	2%
Enfermedad de Alzheimer	4	35%
Cáncer de mama	2	14%

λ_s es el riesgo relativo para un hermano de un probandus, comparado con una persona no relacionada. Compara los riesgos de las enfermedades mendelianas (filas sombreadas) con las enfermedades complejas. Estos son **riesgos empíricos**, derivados de estudios familiares, no de cálculos teóricos. Pueden variar entre poblaciones y también a lo largo del tiempo (la última debido a cambios ambientales). Cuando se utilizan estos riesgos para el consejo genético, es importante utilizar riesgos derivados de estudios adecuados a los antecedentes del consultante. Datos de la Dra. Alison Stewart, Cambridge.

ver la frecuencia de afectación del gemelo. Los gemelos MZ comparten todos sus genes, mientras que los DZ solo comparten de promedio la mitad de sus genes; los gemelos deberían compartir su ambiente en el mismo grado sin reparar en su cigosidad. Así, una mayor concordancia entre gemelos MZ es una evidencia de factores genéticos. Unos gemelos MZ separados al nacer y que hayan crecido en diferentes ambientes dan lugar al estudio perfecto, pero su número es muy pequeño para proporcionar algo mas que unas anécdotas fascinantes.

El resultado final de los estudios familiares, de gemelos o adopciones es una estimación (ver *Figura 13.4*) de la heredabilidad de la enfermedad.

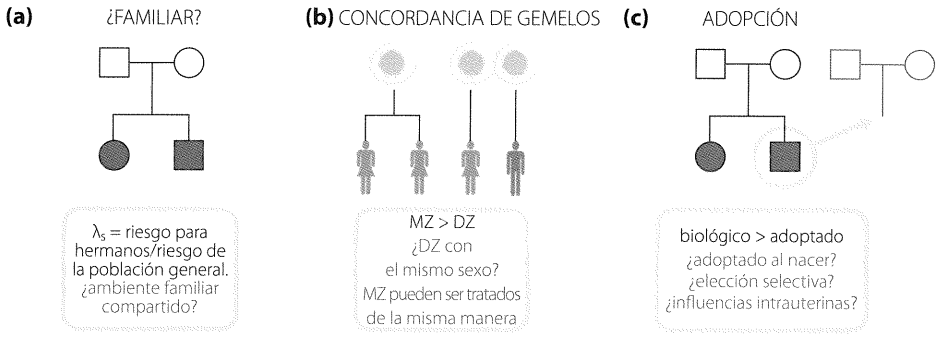


Figura 13.4 – Métodos de demostración de los efectos genéticos en las enfermedades complejas y razones para la cautela en la interpretación de los resultados.

Estudios de ligamiento para identificar factores de susceptibilidad

Una vez establecido que los factores genéticos juegan un papel en la susceptibilidad a la enfermedad elegida, el segundo paso es identificar estos factores. Al igual que en las enfermedades mendelianas la primera aproximación se hace a través del análisis de ligamiento (*Capítulo 9*). El método de laboratorio es el mismo: miembros apropiados de la familia son tipados para un gran panel de marcadores genéticos y los datos se analizan para encontrar marcadores que cosegreguen con la enfermedad. Sin embargo, el análisis es diferente. El análisis estandar de *lod score* exige que el investigador introduzca en el ordenador la penetrancia de cada genotipo, la frecuencia génica, y el ratio de mutación. En las enfermedades mendelianas normalmente es posible hacer una conjetura verosímil para estos parámetros, pero no lo es para las enfermedades complejas. Es, por tanto, necesario utilizar un **análisis de ligamiento no paramétrico.**

Los análisis no paramétricos utilizan familias con más de una persona afecta y consideran la extensión a aquellos miembros de la familia afecta que comparten genes. Los genes, a diferencia de los caracteres, son siempre mendelianos, y es fácil calcular la proporción esperada entre cualquier grupo de parientes. Los parientes afectos deben compartir una proporción excesiva de cualquier gen o marcador que está implicado en la enfermedad, independientemente del modo de herencia. La aproximación más común utiliza parejas de hermanos afectos.

Análisis de parejas de hermanos afectos

El principio del análisis de parejas de hermanos afectos (ASP) es conseguir una colección de parejas de hermanos afectos (100-500 pares) y tiparlos para un amplio panel de marcadores del genoma. Sea una pareja de hermanos con una enfermedad mendeliana recesiva. La *Figura 13.5* muestra cómo compartirían alelos en el locus de un marcador que pueden o no estar ligados al locus de la enfermedad. Véase *Tabla 13.3.* Independientemente del modo de herencia, los marcadores que están ligados a un locus de susceptibilidad deben ser compartidos por los hermanos afectos con una mayor frecuencia que por azar.

El análisis ASP es un método muy potente de análisis de ligamiento no paramétrico. No hay asunciones previas que se hayan demostrado erróneas. Sin embargo, las regiones cromosómicas que define son muy grandes. Con una enfermedad mendeliana, como se vio en el *Capítulo 9*, se puede seguir un análisis

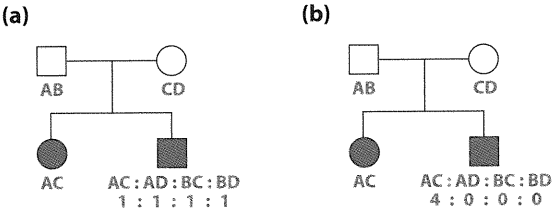


Figura 13.5 – Alelos marcadores compartidos por una pareja de hermanos que son afectos de una enfermedad mendeliana recesiva.
(a) Un marcador que está en un cromosoma diferente al del locus de la enfermedad.
(b) Un marcador que está cercanamente ligado al locus de la enfermedad.
A, B, C, D representan diferentes alelos en el locus del marcador.

Tabla 13.3 – Proporción esperada de alelos marcadores compartidos por una pareja de hermanos afectos

Marcador	Hermanos que no comparten alelos	Hermanos que comparten 1 alelo	Hermanos que comparten 2 alelos
No ligados al locus de la enfermedad	¼	½	¼
Fuertemente ligado a enfermedad rara mendeliana dominante	0	½	½
Fuertemente ligado a enfermedad rara mendeliana recesiva	0	0	1
Ligado a locus de susceptibilidad de enfermedad común	< ¼	> ½	> ¼

Las cifras para las enfermedades mendelianas asumen que ambos hermanos tienen los mismos alelos en el locus de la enfermedad, lo que será verdad según sean de poco frecuentes los alelos de la enfermedad en la población. Para un locus de susceptibilidad para una enfermedad común, no se pueden predecir las proporciones exactas, solo la dirección en la cual las proporciones se desviarán de las esperadas al azar.

de ligamiento en grandes familias hasta el último recombinante, y se puede esperar definir una región candidata que contenga sólo unos pocos genes. Pero en las enfermedades complejas los factores de susceptibilidad no son tan necesarios ni suficientes para el desarrollo de la enfermedad. Como consecuencia, incluso cuando se encuentra un resultado significativo, la región candidata tiene probablemente entre 20 y 50 Mb. Semejante región tiene que ser reducida de alguna manera antes de que el análisis de mutaciones sea posible. Los estudios de asociación son ideales para esto.

Detectar factores de susceptibilidad por asociación

Segmentos ancestrales de cromosoma

Durante la profase I de la meiosis hay un promedio de 60 entrecruzamientos por célula en los hombres y 90 en las mujeres. En promedio, un cromosoma puede ser fragmentado en dos o tres segmentos. De este modo, cuando los hermanos comparten segmentos cromosómicos, estos suelen ser grandes. Pasando de hermanos

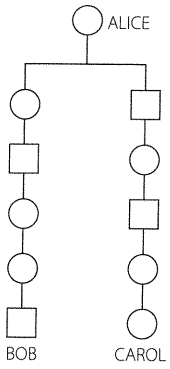


Figura 13.6 – Bob y Carol han heredado un segmento cromosómico de su tatara-tatarabuela Alice. Los eventos de recombinación en diez meiosis han reducido el tamaño del segmento que comparten Bob y Carol.

a parientes cada vez más lejanos, el tamaño de cualquier segmento ancestral compartido se vuelve más pequeño. Considérese un segmento cromosómico que dos parientes lejanos, Bob y Carol, han heredado de un antecesor común (*Figura 13.6*). Un segmento de 10 cM de longitud tendrá solo un 1% de probabilidad de no haberse roto mediante recombinación en una o más de las diez meiosis que separan a Bob de Carol.

Bob y Carol probablemente no sabían que estaban emparentados. Cada uno tiene 32 tatarabuelos e, incluso, aunque tuvieran historiadores entusiastas en la familia, es bastante improbable que conocieran algo acerca de los 32 e identificasen a todos sus descendientes. El mismo argumento se aplica a cada segmento de cada cromosoma en cada persona. Personas que creen no estar emparentadas comparten pequeños segmentos cromosómicos que han sido heredados de un antecesor lejano común. Cuanto más lejano sea el antecesor, mas pequeño será el segmento compartido, pero mayor será el número de personas que lo comparten. Hace N generaciones, tenías 2^N antecesores (*Figura 13.7*). Cada antecesor tendrá como promedio 2^N descendientes si el tamaño de la población permanece constante. Volviendo atrás unas 20 generaciones (de 500 a 1500 años), 2^{20} es alrededor de 1 millón. Al final, todos estamos relacionados. Las palabras "no relacionado" se utilizarán aquí, como en otras ocasiones en genética, para hablar de personas que no comparten ningún bisabuelo.

El antecesor relevante compartido es el común que sea más reciente. Este antepasado es probable que sea más cercano en una población pequeña y aislada que en una grande y extendida, por lo que los segmentos compartidos serán grandes (para un antepasado reciente) o pequeños (para un antecesor lejano). Para segmentos cromosómicos distintos el antepasado en común será diferente, y las personas con las que se comparten los segmentos serán diferentes. Cada

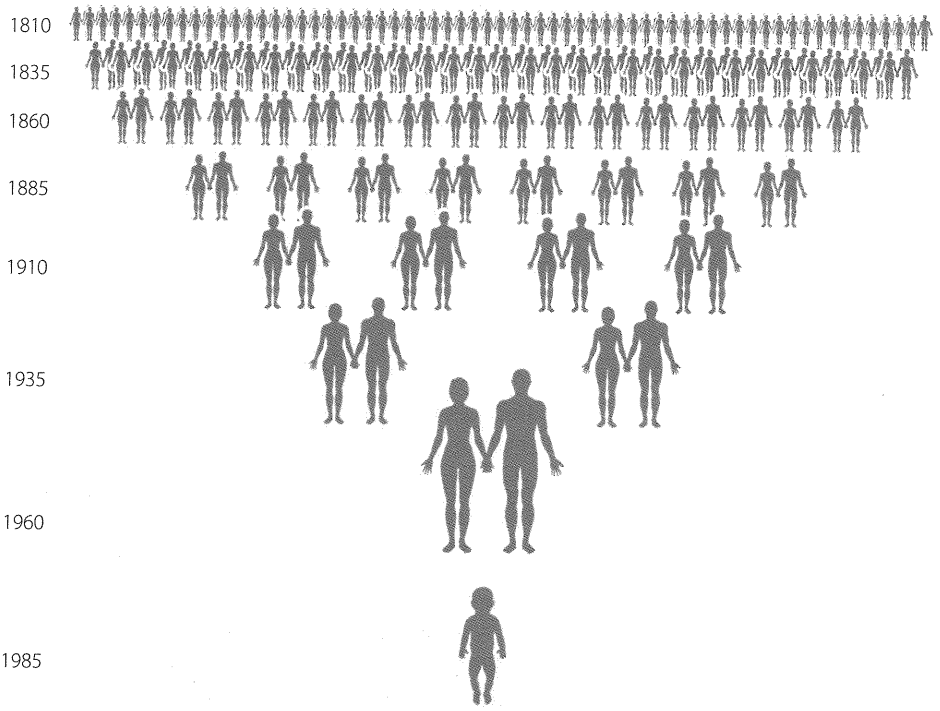


Figura 13.7 – A través de N generaciones, una persona tiene 2^N antepasados. Este número sobrepasa rápidamente la población de muchos países en unos pocos cientos de años. Incluso teniendo en cuenta la endogamia y el aislamiento de las comunidades, todos estamos relacionados a través de antepasados lejanos comunes. (De una idea del Dr. Bryan Sykes.)

segmento cromosómico incluirá marcadores polimórficos que tienen variantes alélicas particulares en ese cromosoma. Cualquier grupo de marcadores alélicos en un segmento ancestral, será compartido en el presente por personas que los han heredado, eliminando las mutaciones ocasionales.

Segmentos ancestrales compartidos y asociación con enfermedad

Supóngase un segmento ancestral que contiene un gen que confiere susceptibilidad a la diabetes. Una colección actual de diabéticos no relacionados tendería a compartir ese segmento cromosómico. El gen no es ni necesario ni suficiente para causar la diabetes, así que no todos los diabéticos compartirán este segmento, y algunas personas sin diabetes lo tendrán, pero como tener el gen aumenta la susceptibilidad, las personas afectas tienen mayor probabilidad que las no afectas de tener ese segmento ancestral.

La búsqueda de tales segmentos compartidos es la base de los estudios de asociación en las enfermedades complejas. Unos pocos cientos o miles de personas afectas son recogidas y tipadas para un gran número de polimorfismos genéticos. Los SNPs son polimorfismos de elección, en parte debido a su abundancia y la disponibilidad de los métodos de genotipado de SNP de alta capacidad, pero también porque es menos probable que muten que los microsatélites. Los microsatélites son más susceptibles de mutar mediante replicación en deslizamiento (ver *Sección 12.4*); la tasa de mutación es lo bastante baja como para hacer de ellos marcadores estables para estudios de ligamiento en familias clave utilizadas para las enfermedades mendelianas, pero cuando se están buscando segmentos cromosómicos ancestrales que han sido transmitidos a través de cientos de generaciones, es más seguro utilizar SNPs.

Se espera que los segmentos compartidos sean pequeños. El proyecto HapMap (ver debajo) sugiere que unas pocas kilobases sería lo normal. Así, es necesario analizar las muestras para marcadores situados cada pocas kilobases para no perder un segmento compartido. Si un segmento ancestral porta un factor de susceptibilidad a una enfermedad, un alelo marcador que se encuentre en ese segmento será más frecuente en las personas afectas que en los controles.

Utilizando la asociación para encontrar factores de susceptibilidad

Existen tres vías en las cuales los estudios de asociación pueden contribuir a identificar factores de susceptibilidad para las enfermedades complejas:

- *Analizar genes candidatos.* El conocimiento de la patología de la enfermedad o los modelos animales pueden sugerir algunos genes candidatos. Los SNPs en y alrededor de un gen candidato son a menudo analizados para la asociación con la enfermedad. La elección de los SNPs puede ser debida al conocimiento de la estructura en bloque del haplotipo alrededor del gen candidato (ver debajo).
- *Estrategia combinada de ligamiento y asociación.* El ligamiento define grandes segmentos compartidos por parientes cercanos, que se pueden detectar con unos pocos centenares de marcadores distribuidos a través del genoma. La asociación define segmentos muy cortos compartidos por personas no relacionadas. La base de datos de SNPs tiene catalogados alrededor de 10 millones de SNPs, uno cada 300 pb aproximadamente. Por lo tanto, para la

mayor parte hay suficientes SNPs disponibles capaces de detectar segmentos compartidos que solo tienen una pocas kb de longitud. Una estrategia natural es, por lo tanto, utilizar el ligamiento (parejas de hermanos afectos) para definir regiones candidatas, y entonces tratar de reducir la región candidata mediante genotipado de alta capacidad de SNP para buscar asociaciones.

- *Estudios de asociación del genoma completo.* El continuo desarrollo de la tecnología de genotipado de alta capacidad ha hecho factible realizar los estudios de asociación a través del genoma completo. Un SNP cada 5 kb o incluso cada kb sería necesario para estudiar cada segmento cromosómico posible. Esto se traduce entre 600.000 y 3.000.000 de SNPs. Como se describe debajo, se debe utilizar un umbral sumamente riguroso para la significación estadística de la asociación, debido al gran número de asociaciones potenciales estudiadas. Lo que significa que se necesita una gran cantidad de muestras. La escala de trabajo resultante va más allá de los recursos de la institución más poderosa económicamente o de colaboraciones. Una aproximación para reducir la escala es trabajar en pequeñas poblaciones aisladas. Ya que la mayoría de las personas comparten antecesores comunes relativamente recientes, los segmentos compartidos son grandes en promedio y pueden ser detectados con pocos marcadores. Esta es la base, por ejemplo, del proyecto DeCode (ver www.DeCode.com), que estudia la población de Islandia.

Los resultados de esto en la enfermedad de Alzheimer y en la Diabetes Tipo 2 se describen en la próxima sección. Al final se verán las ventajas y limitaciones de los estudios de ligamiento y asociación en enfermedades complejas.

Interpretación de las asociaciones

Un estudio de asociación con éxito puede mostrar que el alelo X del marcador Y es un 20% más frecuente en las personas con una enfermedad Z que en los controles. Esto no significa necesariamente que X confiera susceptibilidad a Z. Las explicaciones alternativas son:

- La asociación es una casualidad estadística (error Tipo 1) y no se encontraría en una segunda muestra independiente.
- Los casos y los controles fueron mal emparejados; X es irrelevante para la enfermedad, pero los casos fueron recogidos de un subgrupo de la población que tienen mayor frecuencia de X que los controles.
- X no confiere por sí mismo susceptibilidad a la enfermedad Z, pero está en el mismo segmento cromosómico ancestral que el factor de susceptibilidad real; este es un ejemplo del **desequilibrio de ligamiento** (ver *Cuadro 13.2*).

En la *Sección 13.4* se discutirá cómo distinguir entre estas posibilidades e identificar la verdadera causa de una asociación.

13.3. Estudio de pacientes

En las enfermedades multifactoriales rara vez existe un beneficio derivado de las investigaciones genéticas de pacientes *individuales*; si en el futuro pudiera haber más beneficios se discutirán en la sección final. Las investigaciones de grupos de pacientes han sido el pilar de la investigación de la susceptibilidad genética para todas las enfermedades complejas. Así, para las dos enfermedades descritas

Cuadro 13.2

Asociación y ligamiento

Ligamiento es una relación entre los **loci**, no entre los alelos. En el ejemplo de la *Tabla 9.1* el locus *D1S252* está ligado al locus de la discromatosis. Este es el caso independientemente de cuál sea el alelo en un cromosoma determinado que porta la enfermedad y el loci marcador.

Asociación (en un ejemplo de genética) es la relación entre **alelos** o fenotipos. Un alelo marcador particular, no el locus marcador, está asociado a una enfermedad. La asociación es con la enfermedad actual (el fenotipo), no con un locus de susceptibilidad a la enfermedad que puede tener alelos de alto riesgo o de bajo riesgo. Un alelo y un locus marcador pueden también estar asociados con un alelo en otro locus marcador.

El ligamiento no implica una asociación basada en la población. Por ejemplo, en la *Figura 9.7*, se examinan una gran variedad de alelos diferentes para cada marcador, tanto en los cromosomas portadores de la enfermedad como en los normales. Dentro de una familia, hay una asociación; por ejemplo, en la Familia 1 todos menos uno de los 10 individuos afectos tienen el alelo 1 *D1S2777* en su cromosoma portador de la enfermedad. Pero la asociación ocurre únicamente en esa familia. Las personas afectas de las otras familias tienen el alelo 3 o 5 de este marcador.

Ligamiento y asociación se solapan cuando la familia y la población general se solapan. Cuando muchos miembros de la población actual comparten segmentos cromosómicos ancestrales, para que ocurra deben ser miembros de una familia enorme muy extendida, y los loci que están ligados en esos segmentos producen asociaciones poblacionales entre los alelos relevantes. A esto se le denomina normalmente **desequilibrio de ligamiento**. El desequilibrio de ligamiento es un fenómeno que puede tener otras causas evolutivas. Sin embargo, cuando los genetistas humanos hablan de desequilibrio de ligamiento siempre quieren decir asociación alélica debida a segmentos cromosómicos ancestrales compartidos.

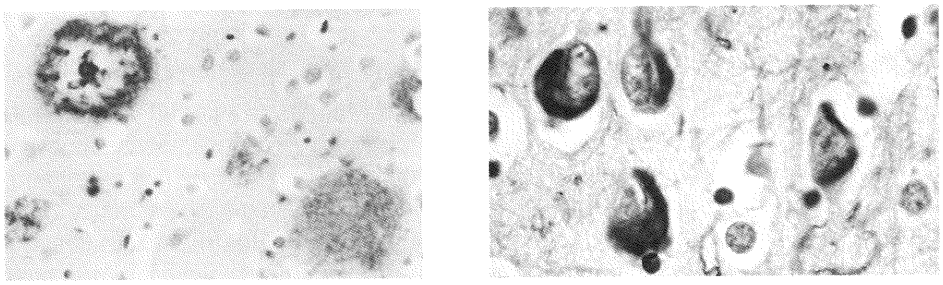
en los Casos 25 y 26, primero se describirá el consejo que un genetista podría dar a un pariente ansioso y después se describirá la investigación en grupos de individuos afectos. En la sección final se verán en un marco más general.

CASO 25 | Familia Yamamoto | 329 | **341** | 376

- Historia familiar de demencia
- ? Enfermedad de Alzheimer
- ¿Análisis de ApoE4?

Cuando Bill Yamamoto habló con la genetista, confirmó la afirmación de su médico de que un comienzo temprano de la enfermedad de Alzheimer está fuertemente relacionado con ser una forma hereditaria. La enfermedad en la madre y la tía de Bill era la forma común de comienzo tardío. Ambas formas se definen por la misma patología cerebral post-mortem, con placas seniles extracelulares abundantes y enmarañamiento intracelular de neurofibrillas (*Figura 13.8*), pero la forma de comienzo tardío no es fácilmente heredada. Bill inquirió a la genetista sobre la ApoE4. Ella le confirmó que existe una asociación estadística con el comienzo tardío de la enfermedad de Alzheimer, y es válida en personas de origen japonés y europeo. Varios estudios han mostrado una frecuencia del alelo E4 de 0,25–0,3 en pacientes japoneses con la enfermedad de Alzheimer, comparado con el 0,10 de los controles. Sin embargo, ella le desaconsejó el análisis. Le mostró un informe del análisis de ApoE publicado por un grupo de trabajo del American College of Medical Genetics y la American Society of Human Genetics (1995) que concluía "... actualmente no se recomienda su uso rutinario en diagnóstico clínico ni debe ser utilizado para análisis predictivos".

Cuando Bill sugirió que esta actitud era paternalista, ella le preguntó qué haría si el resultado era positivo. "Preguntarte lo que debo hacer para evitar desarrollar la enfermedad", respondió. "Pero no hay nada que yo pueda decirte. No hay recetas para prevenir la enfermedad de Alzheimer, aunque existen medicamentos que pueden ralentizar la progresión. Lo mejor que puede hacer es mantener su mente activa, pero le diría esto a cualquiera, sin reparar en sus circunstancias. "¿Y qué haría si el resultado fuera negativo?". "¡Celebrarlo!", "Estaría equivocado muchas personas ApoE4-negativas desarrollan la enfermedad de Alzheimer. La asociación es solo estadística. No es predictiva para un individuo". Le dio una copia de un artículo de Holzman de análisis genético para que se la llevara y la leyera, como protección contra algunas de las persuasivas ofertas de internet (Holzman, 1999). La consulta no tranquilizó a Bill en cuanto a su riesgo, pero le persuadió de que gastar dinero en tests no le proporcionaría tranquilidad.



(a) (b)

Figura 13.8 – Patología característica del cerebro de la enfermedad de Alzheimer.
(a) Placas amiloides y (b) enmarañamiento neurofibrilar. Fotos cortesía del Dr. Simon Lovestone, Institute of Psychiatry, Londres.

Alrededor del 1% de los casos de la enfermedad de Alzheimer tienen un comienzo anterior a los 60 años de edad. Estos casos de comienzo temprano son con frecuencia familiares y a menudo se comportan como enfermedades mendelianas dominantes. Son sensibles al análisis de ligamiento estándar y a la clonación posicional. Estas aproximaciones han identificado tres genes causales (*Tabla 13.4*).

Las placas seniles en la enfermedad de Alzheimer están formadas en gran parte por proteína β-amiloide, mientras que los enmarañamientos neurofibrilares están formados por proteína tau. La β-amiloide deriva de la proteína precursora amiloide (APP) mediante escisión proteolítica. APP es una proteína cerebral de 695

Tabla 13.4 – Causas conocidas del comienzo temprano de la enfermedad de Alzheimer

Gen	Nº OMIM	Localización	Nº de familias recogidas	Producto
APP	104760	21q21	39	Precursor de proteína amiloide
PSEN1	104311	14q24	258	Subunidad γ-secretasa
PSEN2	600759	1q31	15	Subunidad γ-secretasa

El número total de familias recogidas pertenece a Bertram y Tanzi (2004). En total estas causas explican solo una pequeña fracción de toda la enfermedad de Alzheimer; la gran mayoría de los casos son de comienzo tardío y no familiar.

aminoácidos que es escindida por la enzima γ-secretasa, produciendo los péptidos $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$. Se piensa que $A\beta_{42}$ es la variante patogénica. La γ-secretasa es un complejo de cinco polipéptidos, incluyendo los productos génicos de PSEN1 y PSEN2. En las formas mendelianas raras de la enfermedad de Alzheimer está claramente implicada la amiloide como causa de la patología, y no solo como un efecto colateral de otra causa.

Los genetistas tienen mucho que ofrecer a los miembros de las familias afectas de la enfermedad de Alzheimer de comienzo temprano. El ligamiento y la detección de mutaciones pueden ser utilizados para tratar de identificar una mutación causal. Si se describe una, se puede ofrecer un test predictivo, del mismo modo que para la enfermedad de Huntington. En el capítulo siguiente se describe un protocolo conveniente (*Cuadro 14.2*). Sin embargo, como Bill Yamomoto descubrió, con las formas de comienzo tardío estamos todavía en la fase de investigación y, actualmente, los servicios de genética no tienen nada útil que ofrecer. Cualquier estudio de ligamiento y asociación ha sido desarrollado para tratar de identificar factores de susceptibilidad, pero con la excepción de *APOE*4*, discutida más abajo, los resultados no han sido todavía identificados como predictores útiles de la enfermedad o dianas válidas para nuevos medicamentos.

En el análisis de ligamiento, las parejas de hermanos afectos son el material más obvio. Las personas clasificadas como no afectas pueden desarrollar la enfermedad de Alzheimer más tarde, así que es mejor realizar estudios limitados a personas afectas. Rara vez hay disponibles varias generaciones de una familia y la búsqueda de tales familias predispone la muestra a investigar hacia los casos de comienzo temprano, que pueden no ser típicos. Se han publicado muchos estudios de ligamiento en todo el genoma, pero todos han mostrado *lod scores* bajos. El *Cuadro 13.3* muestra un amplio grupo de umbrales significativos aceptados para el cribado del genoma completo. Utilizando estos criterios, ninguna investigación ha encontrado un resultado altamente significativo. Entre los resultados *significativos* o *sugestivos*, las regiones implicadas en un cribado de todo el genoma, rara vez han sido replicadas en otros. Estos resultados decepcionantes son típicos de los

Cuadro 13.3

Umbrales de significación en los estudios de ligamiento de todo el genoma

En el *Capítulo 9* se vio que el umbral de significación de un *lod score* es 3,0. La probabilidad de conseguir un lod score tan alta, si realmente no hay ligamiento para ese marcador, es de 0,05. Si se utilizan cientos de marcadores para explorar el genoma entero, la posibilidad de que alguno de ellos dé un resultado falso positivo es claramente más alta que si se utiliza sólo un único marcador. Saber cuánto más alta, es bastante difícil estadísticamente. Siguiendo a Lander y Kruglyak (1995), los resultados de un cribado de todo el genoma se dividen en:

- evidencia altamente significativa de ligamiento (*lod score* > 5,4)
- evidencia significativa de ligamiento (*lod score* > 3,6)
- evidencia sugestiva de ligamiento (*lod score* > 2,2)

Estos umbrales son escogidos para dar probabilidades de 0,001, 0,05 y 1, respectivamente, de encontrar un *lod score* tan alto una vez en un cribado de todo el genoma usando la hipótesis nula de no ligamiento verdadero. Los *score* en las categorías más bajas tienen poco peso hasta que estudios independientes los replican.

estudios de ligamiento de las enfermedades complejas; las razones posibles se discuten en la *Sección 13.4*. Sin embargo, hay razones para varias localizaciones posibles. La revisión de Bertram y Tanzi (2004) enumera 12 regiones cromosómicas con evidencia de ligamiento en más de un estudio, y discute la evidencia que la sostiene. En total, este trabajo ha sugerido varias regiones cromosómicas que son dignas de mayor investigación, pero no ha encontrado la localización de factores de susceptibilidad determinados como 19q13, la localización del gen de*APOE*.

Se han examinado alrededor de 100 genes para las variantes asociadas a la enfermedad de Alzheimer. Estos incluyen candidatos posicionales sugeridos por estudios de ligamiento y genes candidatos sugeridos por la patología de la enfermedad de Alzheimer. Se han descrito muchas asociaciones, pero ninguna se ha confirmado, exceptuando *APOE*4*. Una vez más Bertram y Tanzi (2004) revisaron la evidencia. Además de *APOE*4*, los resultados de los muchos estudios proporcionan indicadores para hacer más estudios, pero no han identificado ningún factor de susceptibilidad definitivo de la enfermedad de Alzheimer. La relevancia de *APOE*4*, sin embargo, es indiscutible.

El gen *APOE* en el cromosoma 19q13 codifica para la apolipoproteína E. Se han descrito muchas variantes de ApoE (ver OMIM 107741), pero sólo tres son polimorfismos comunes. E2, E3 y E4 son variantes de secuencias codificantes que producen proteínas ApoE con cisteína o arginina en las posiciones 112 y 158 (*Tabla 13.5*). Esto produce diferencias funcionales en el manejo de los lípidos. La variante E4 está asociada con niveles plasmáticos más elevados de colesterol total y LDL colesterol que en los homocigotos E3. Las frecuencias génicas se han estudiado en muchas poblaciones. E4 es un alelo ancestral, encontrado en primates no humanos, y es frecuente en las poblaciones donde el pastoreo todavía es importante. En las poblaciones agrícolas su frecuencia es baja.

Tabla 13.5 – Las variantes comunes de la apolipoproteína E y sus frecuencias génicas en varias poblaciones

	Residuo 112	Residuo 158	España	Reino Unido	China	Japón	Nativos americanos	Khoi San
E2	Cisteína	Cisteína	0,052	0,089	0,105	0,048	0,0	0,077
E3	Cisteína	Cisteína	0,856	0,767	0,824	0,851	0,816	0,553
E4	Arginina	Arginina	0,091	0,144	0,071	0,101	0,184	0,370

Datos de Corbo y Scacchi (1999) *Ann. Hum. Genet.* **63**: 301–310.

Entre las personas que viven en un entorno occidentalizado, E4 es un factor de riesgo para enfermedades coronarias y enfermedad de Alzheimer de comienzo tardío. Entre los europeos y los norteamericanos de origen europeo, la heterocigosidad u homocigosidad para *APOE*4* incrementa 3 y 15 veces, respectivamente, el riesgo de enfermedad de Alzheimer; *APOE*4* supone el 20-30% del riesgo total. Se asocia con alto riesgo y comienzo temprano de la enfermedad. Sin embargo, el mecanismo que lo produce lo no está claro.

Bertram y Tanzi (2004) concluyen su revisión preguntando: "¿Qué deberíamos contarles a los pacientes?". Su respuesta es "no mucho", todavía. Ellos repiten las opiniones de varios paneles de expertos que han advertido contra el uso de ApoE u otros presuntos factores de riesgo para fines clínicos. El genotipado de ApoE no ayudaría al diagnóstico de una persona con una posible enfermedad de Alzheimer y no sería útil para predecir la probabilidad de que alguien desarrolle la enfermedad. Un estudio británico concluyó que el poder predictivo era demasiado bajo para influir en la contratación de seguros, incluso para los seguros sanitarios a largo plazo (Warren, 1990). ApoE ha sido bastante bien analizado como parte de una investigación de dislipemias, y esto aumenta la delicada cuestión de si los pacientes deben conocer resultados que son irrelevantes a su problema lipídico y les pueden preocupar. Inevitablemente, el test de ApoE también está disponible en internet, pero el resultado final puede ser solo un falso optimismo o pesimismo para cualquiera que se lo tome en serio.

CASO 26 | Familia Zuabi | 330 | **345** | 376

- Zafira, mujer de 52 años
- Sobrepeso; estilo de vida sedentario; sed insaciable
- Diabetes Tipo 2
- Análisis de su hijo

La diabetes mellitus, definida por hiperglucemia > 7 mmol/l en ayuno, > 11 mmol/l sin ayuno, o test de tolerancia a la glucosa, es una enfermedad heterogénea. Los dos tipos mayoritarios son:

- Tipo 1 (T1D): comienzo repentino en personas jóvenes, resultado de un ataque autoinmune a las células β pancreáticas y no asociada a obesidad.
- Tipo 2 (T2D): comienza de adulto, asociada con obesidad e inactividad física, sin características autoinmunes y resultado de una combinación de una secreción inadecuada de insulina y la resistencia a sus efectos.

Las dos enfermedades, por separado, implican susceptibilidad genética y factores ambientales. En la T2D, la evidencia de los factores ambientales proviene del alarmante incremento en la prevalencia (en Estados Unidos un incremento del 40% durante el periodo 1990–1999, con un mayor aumento desde 1999) y de los estudios de intervención que muestran la eficacia del control del peso y el ejercicio. La evidencia de los factores genéticos proviene de los estudios familiares y de gemelos y de la variación étnica en la prevalencia. La λ_S es 4–6 y muchos estudios han detectado mayor concordancia en gemelos monocigóticos que en dicigóticos. Una historia familiar positiva aumenta el riesgo en 2,4 veces; el 15%-25% de los parientes de primer grado de los pacientes T2D desarrollan defectos de tolerancia a la glucosa o diabetes. La prevalencia varía mucho entre los diferentes grupos étnicos, incluso cuando los miembros de los grupos viven mezclados en comunidades multiétnicas. Algunas variantes de T2D (MODY y T2D mitocondrial, ver debajo) son heredadas como enfermedades que afectan a un único gen, pero éstas suponen menos del 10% del total.

Con respeto al consejo genético, la familia Zuabi es bastante típica. Un grupo solapado de problemas (T2D, enfermedad cardiovascular, enfermedad coronaria) se agrupa en familias. El síndrome metabólico es un factor predictor claro, como son sus componentes individuales. Mientras una historia familiar fuerte predice un riesgo incrementado, el consejo genético específico es pequeño: el consejo general para todas las personas inactivas y con sobrepeso, a pesar de su histo-

ria familiar, es hacer ejercicio y perder de peso. Los múltiples medicamentos se prescriben de acuerdo a la fisiología y no a la genética.

El reciente crecimiento epidémico de T2D ha propiciado su estudio. Con respecto a las causas genéticas, se han hecho estudios de ligamiento a más de 50 familias o a parejas de hermanos y numerosos estudios de asociación. Los resultados para la T2D son los típicos de las enfermedades complejas.

Estudios de ligamiento: utilizando el criterio de Lander–Kruglyak (*Cuadro 13.3*), ninguna investigación ha encontrado un resultado significativo. Solo unas pocas regiones resultan significativas en un examen simple, o han sido bien replicadas en otros estudios. La mayoría de los estudios encuentran *lod scores* que a lo mejor son sugestivos, pero esto no coincide con las localizaciones de otros estudios. Casi todas las regiones cromosómicas han mostrado evidencias sugestivas de ligamiento en uno u otro estudio, y casi ninguno de los ligamientos sugestivos ha sido replicado. La *Tabla 13.6* resume los resultados más positivos de esta enorme cantidad de trabajo.

Estudios de asociación: solo se ha identificado un factor de susceptibilidad putativo siguiendo la estrategia de dos pasos perfilada en la sección previa. La clonación posicional en el pico de ligamiento en 2q37 apunta al gen de la cal-

Tabla 13.6 – Posibles localizaciones de los loci de susceptibilidad para T2D sugeridos por análisis de ligamiento

Estudio inicial			Estudio de apoyo	
Población	**Localización**	**Lod**	**Población**	**Lod**
Indios pima	1q25.3	4,1	Americanos caucasianos	4,3
			Franceses caucasianos	3,0
			Caucasianos de Reino Unido	1,5
Mexicanos	2q37.3	4,1	Americanos caucasianos	2,2
			Chinos	2,1
Mexicanos	3p24.1	3,9	Mexicanos	1,3
			Mexicanos	2,7
			Finlandeses caucasinos	1,1
Franceses caucasianos	3q28	4,7	Japoneses	1,4
			Aborígenes australianos	1,8
Mexicanos	10q26.13	3,8	Caucasianos de Reino Unido	2,0
Finlandeses caucasianos	12q24.31	3,6	Americanos caucasianos	1,5
			Islas del Pacífico	3,7
			Finlandeses caucasianos	1,9
Finlandeses caucasianos	18p11.22	4,2	Americanos caucasianos	2,4

Estos han sido elegidos entre el gran número de estudios que mostraron *lod scores* insignificantes en estas localizaciones. Reproducido de Florez *et al.* (2003) con su permiso. © 2003 Annual www.annualreviews.org.

paína-10 (*CAPN10*). Esta no está en ninguna lista de probables factores de susceptibilidad, mostrando el poder de la clonación posicional para producir nuevos descubrimientos en la patogénesis. En el estudio original, la susceptibilidad fue atribuida a una combinación de los tres SNPs no codificantes. Pero estudios posteriores han fallado en el intento de clarificar la naturaleza del determinante de la susceptibilidad, y no todos han confirmado su existencia. En un segundo ejemplo, se ha intentado asociar los SNPs en el gen de la calsecuestrina (*CASQ1*) en el punto de ligamiento 1q25 con un riesgo incrementado de T2D.

La mayoría de los estudios de asociación han escogido los genes pensando en la probabilidad de que estuvieran implicados en la patogénesis, más que en las regiones cromosómicas sugeridas por los estudios de ligamiento. La *Figura 13.9a* muestra los acontecimientos complicados que controlan la señalización de la insulina. Claramente, la lista de los genes candidatos posibles es muy larga.

Estos estudios han dado lugar a más de 30 genes como posibles variantes de la susceptibilidad, pero como con los estudios de ligamiento, muy pocas de las asociaciones presentadas han sido reproducidas. Un gran **meta-análisis** que incluye alrededor de 25.000 casos ha confirmado el papel de una variante sin sentido (p.Pro12Ala) en el gen *PPARG* que codifica un receptor nuclear hormonal. El alelo común Pro (frecuencia del 85% en europeos) confiere un modesto incremento del riesgo (ratio de riesgo 1,27), pero como es tan común, este polimorfismo explica el 25% del riesgo atribuible a la población (ver *Capítulo 11*) para T2D. Las variantes en dos de las dianas de los medicamentos utilizados comúnmente para tratar la T2D también han sido implicadas de forma convincente en la susceptibilidad a la enfermedad (*ABCC8* y *KCNJ11*).

Relación entre las formas monogénicas y las complejas: un criterio común de la susceptibilidad de la enfermedad compleja es que los genes de las rutas relevantes tienen mutaciones principales que causan enfermedades mendelianas y variantes menores que actúan como factores de susceptibilidad en la enfermedad compleja. Las formas mendelianas de T2D son conocidas. MODY (diabetes de comienzo adulto en los jóvenes) es una enfermedad autosómica dominante de comienzo temprano. No hay asociación con obesidad o estilo de vida, pero se parece mucho a la forma que comienza en la edad adulta. El ligamiento, la clonación posicional y los genes candidatos, han identificado siete genes diferentes cuyas mutaciones puede producir MODY (ver OMIM 606391). La identificación de estos genes ha aclarado los mecanismos que controlan la homeostasis de la glucosa y la respuesta a insulina. ¿También nos ha ayudado a entender la susceptibilidad a T2D? Muy poco. Solo uno de los genes de MODY *(HNF4A, MODY1)* coincide con un pico de ligamiento replicado de T2D (en 20q13, demasiado débil para incluirlo en la *Tabla 13.3,* pero apoyado por los *lods* de 2,2 y 2,9 en finlandeses y chinos). Los estudios iniciales no han encontrado asociación con el comienzo adulto de la enfermedad, pero algunos estudios recientes apoyan el papel de los SNPs de *HNF4A* en la susceptibilidad a T2D.

Se han relacionado varias mutaciones en el ADN mitocondrial con la diabetes, a menudo complicadas con otros factores como la sordera. Hay pruebas de una malfunción mitocondrial en la T2D típica (ver Stumvoll *et al.*, 2005), pero no se ha asociado ninguna variante de ADN mitocondrial con el tipo común de T2D.

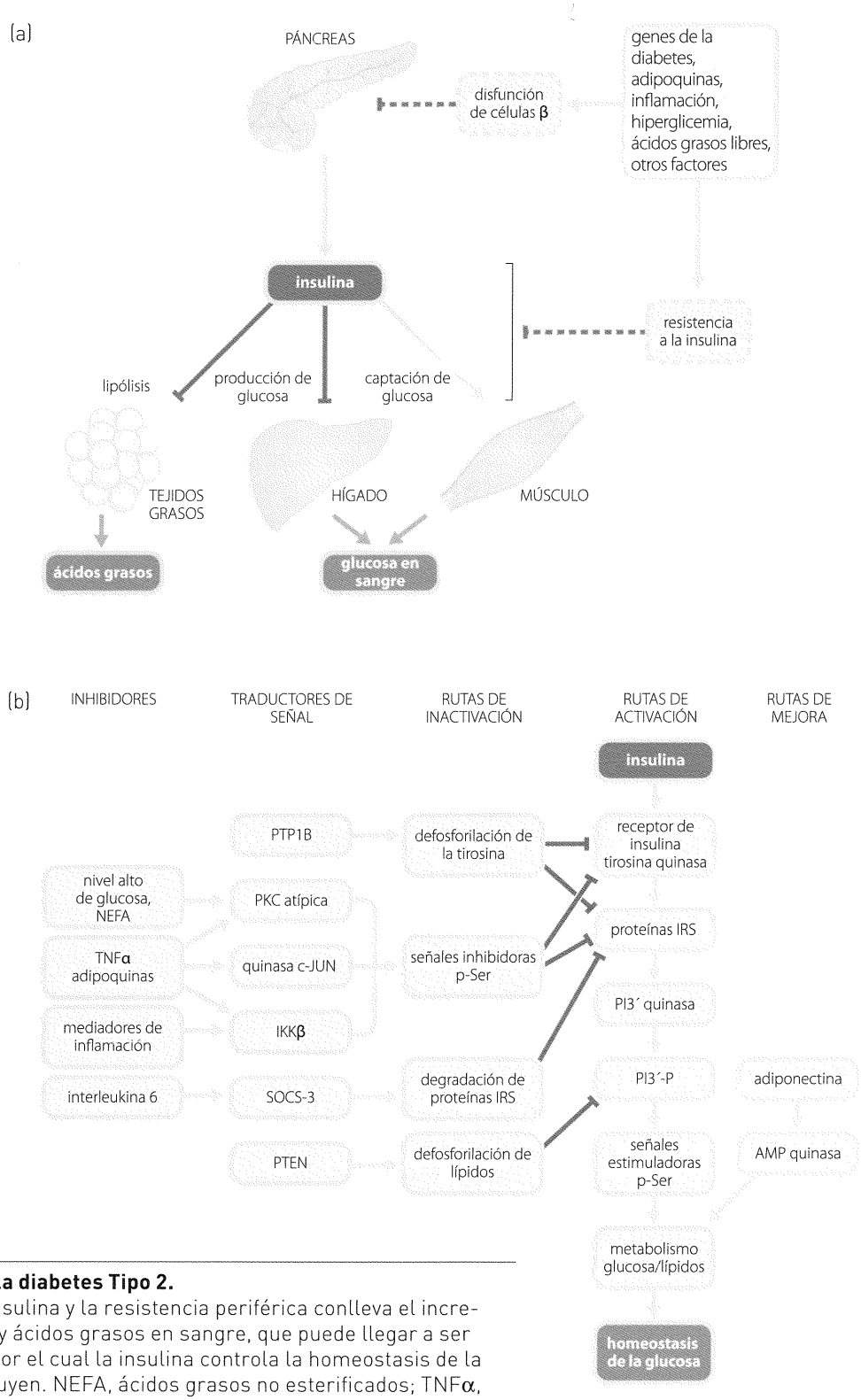


Figura 13.9 – Fisiopatología de la diabetes Tipo 2.
(a) La secreción disminuida de insulina y la resistencia periférica conlleva el incremento de los niveles de glucosa y ácidos grasos en sangre, que puede llegar a ser autorreforzada. (b) Mecanismo por el cual la insulina controla la homeostasis de la glucosa y los factores que lo influyen. NEFA, ácidos grasos no esterificados; TNFα, factor de necrosis tumoral α, fosfotirosinfosfatasa 1B; PKC, proteinquinasa C; IKKβ, NFκB unidad inhibidora de kinasa (un activador de NFκB); SOCS-3, supresor de la señalización de citoquina 3; IRS, sustrato del receptor de insulina; PI, fosfoinositol. Ambas figuras reproducidas de Stumvoll *et al.* (2005) con permiso de Elsevier.

En general, la investigación genética en una T2D de comienzo adulto ha estado marcada por inversiones masivas de tiempo y recursos para conseguir resultados muy pobres. Algunas personas se quejan de que ocurre porque se persigue de manera obstinada la hipótesis incorrecta y que, de hecho, T2D es una alteración de la programación epigenética, como se describe en el *Capítulo 7*. Sin embargo, dado el gran número de posibles participantes en la patogénesis (ver *Figura 13.9*), es muy probable que el problema sea la extensa heterogenicidad genética con variantes génicas que no tienen un efecto principal. Se recomienda la lectura de la revisión de Florez *et al.* (2003), no por los detalles objetivos, sino porque da una idea muy buena de la extrema dificultad de alcanzar conclusiones definitivas en este campo.

13.4. **Resumen y ampliación**

Los ejemplos de la enfermedad de Alzheimer y la T2D son bastante típicos de la frustrante naturaleza de la investigación de las enfermedades genéticas complejas. Este campo ha mostrado tener muchas más dificultades de lo que se esperaba. Cuando la comunidad genética se embarcó en los estudios de ASP para las enfermedades comunes a principios de los noventa, muchas personas creyeron que la mayoría de los factores serían identificables mediante el análisis de unos pocos cientos de parejas de hermanos afectos. Ocurrió que los *lod scores* generalmente eran débiles y los estudios de cada enfermedad estaban llenos de problemas para reproducir los hallazgos positivos.

Un fallo en la reproducibilidad de un hallazgo no significa necesariamente que sea erróneo. Un estudio inicial del genoma completo informa de cualquier región que da lugar a un *lod score* interesante. Un estudio de replicación tiene que encontrar un buen *score* para esa región en particular, lo cual es una tarea muy demandada. Si hay unos pocos o muchos loci de susceptibilidad, pero los estudios son marginales para detectar cualquier efecto, es bastante improbable que un estudio pueda replicar los hallazgos del otro. Aunque esto es comprensible, no ayuda a los investigadores a tratar de identificar los verdaderos ligamientos en un mar de resultados no significativos. Aunque el método de ASP es robusto, los cálculos de Risch y Merikangas (1996) muestran que sólo es capaz de detectar los factores de susceptibilidad altamente potentes (*Tabla 13.7*). La conclusión tras 15 años de esfuerzo es que la susceptibilidad a las enfermedades más comunes es el resultado acumulado de muchos factores débiles más que de unos pocos fuertes.

El artículo de Risch y Merikangas fue enormemente influyente porque no solo identificaba el problema, sino que proponía una solución. Mostraron que los estudios de asociación pueden detectar factores de susceptibilidad más débiles que los análisis de ligamiento, utilizando un número factible de sujetos. Sus cálculos ayudaron a estimular el cambio del ligamiento hacia los estudios de asociación. Normalmente toman la forma de estudios caso-control de polimorfismos en genes candidatos y sugeridos por el conocimiento de bioquímica o fisiología de la enfermedad en cuestión. Sin embargo, los estudios de asociación se enfrentan a numerosos problemas.

Tabla 13.7 – Números de parejas de hermanos afectos necesarios para detectar un factor de susceptibilidad a una enfermedad

Riesgo relativo de la enfermedad debido a este locus	5x	3x	2.5x	2x	1.5x
Probabilidad del alelo compartido por hermanos afectos	0,634	0,556	0,536	0,518	0,505
Parejas de hermanos afectos necesarias para detectar el efecto	94	559	1366	5379	67805

Las parejas de hermanos afectas tienen gran poder para detectar factores que incrementan el riesgo para un factor por encima de 3. La pobreza de resultados de los análisis de parejas de hermanos afectos sugiere que la mayoría de los factores de riesgo tienen efectos más pequeños que esto. Datos de Risch y Merikangas (1996).

Problemas con los estudios de asociación

Análisis múltiples

Los estudios de asociación han producido una y otra vez un torrente de resultados positivos, muy pocos de los cuales han sido confirmados. La revisión de Florez *et al.* (2003) da una idea de los datos en un área. Un problema es el análisis múltiple. Cuando un gran número de SNPs son analizados para ver su asociación con una enfermedad, es necesario pensar en el umbral de significación estadística. Se consideran dos umbrales posibles:

- Una posibilidad de 0,05 de que *este SNP particular* muestre una desviación mayor de la esperada al azar.
- Una posibilidad de 0,05 de que *alguno de entre 1000 SNPs analizados* muestre una desviación mayor de la esperada al azar.

Claramente un resultado que es significativo, utilizando el umbral más exigente es más creíble. Esto es análogo a los umbrales de ligamiento mostrados en el *Cuadro 13.3*. La corrección más rigurosa para el análisis múltiple **(corrección de Bonferroni)** consiste en multiplicar el valor *P* para cada pregunta simple por el número de preguntas realizadas. Así para un análisis de 1000 SNP se necesita un valor *P* individual de 0,00005 para dar un valor total de *P* de 0,05. Los investigadores detestan no informar de una asociación con un valor de *P* de 0,0001 si este es el mejor resultado de muchos meses de duro trabajo.

Reproducción de un hallazgo positivo

Si existen 20 asociaciones verdaderas con la enfermedad, pero solo una se detecta en un estudio, esa probablemente atravesará el umbral de significación por una afortunada combinación de genotipos en las muestras utilizadas. Un estudio de replicación probablemente no lo encuentre, incluso aunque sea verdadero, a menos que el estudio de replicación sea estadísticamente más potente que el original. Una manera de conseguir mayor poder estadístico es limitar el número de preguntas realizadas, pero es frustrante realizar todo el trabajo de recogida de una muestra de replicación y solo tipar unos pocos marcadores, cuando un laboratorio está bien equipado como para hacer un cribado de todo el genoma. Sin embargo, un metaanálisis de estudios de asociación en varias enfermedades

(Lohmueller *et al.*, 2003) dio motivos para un cauto optimismo. Se han considerado todos los estudios asociación publicados de T2D, enfermedad bipolar y esquizofrenia, más todos los estudios en otras ocho asociaciones publicadas elegidas al azar. En conjunto, se han analizado todos los estudios publicados de 25 asociaciones de un genotipo particular con una determinada enfermedad. En ocho de estos 25, el meta-análisis apoyó una asociación verdadera, mientras que en los otros 17 fue no concluyente o negativa. Los ratios de riesgo para las 8 asociaciones confirmadas se extendían entre 1,07 y 2,28. La conclusión final es que las asociaciones iniciales presentadas a menudo pueden sen ciertas, pero esta confirmación requiere mayores estudios de los que se realizan, y los ratios de riesgo iniciales son casi siempre más altos.

Emparejar casos y controles

Un área difícil en los estudios de asociación es el emparejamiento de casos y controles. El emparejamiento de sexos y edades no debe ser importante (la frecuencia de un alelo marcador no depende de ninguna de estas variables); pero ¿es suficiente utilizar personas del mismo grupo étnico y país como controles, o deberían ser de la misma localidad? Muchas poblaciones muestran una estructura a pequeña escala, como se espera ya que la población local tenga más probabilidad de formar parte de la misma gran familia. Las asociaciones fuertes no deben ser sensibles a las pequeñas variaciones locales en la frecuencia de un alelo marcador, pero los grandes estudios actuales buscan efectos bastante sutiles y necesitan un emparejamiento más cuidadoso con los controles. Una solución es utilizar controles internos, donde el cromosoma no transmitido de uno de los padres se utiliza como control (Test de Transmisión en Desequilibrio, TDT).

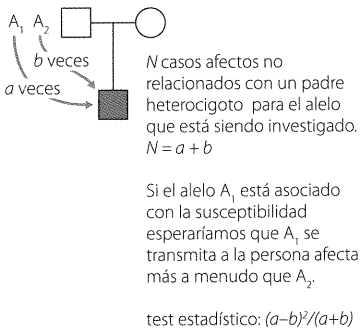


Figura 13.10 – Test de transmisión en desequilibrio. El test estadístico tiene una distribución χ^2.

Test de transmisión en desequilibrio: El TDT evita cualquier riesgo de desigualdad entre casos y controles utilizando los cromosomas parentales no transmitidos como controles. La muestra en estudio consiste en los casos y sus dos padres. Es irrelevante si los padres son afectos o no. Para analizar la asociación con un alelo particular de un marcador, solo los padres heterocigotos para ese alelo son informativos. El análisis, simplemente, compara la frecuencia en que el padre heterocigoto transmite al paciente afecto el alelo en cuestión, frente a su otro alelo (*Figura 13.10*). La significación se calcula con un test χ^2 simple.

El TDT se adapta bien a las enfermedades infantiles, pero es complicado en la enfermedad de Alzheimer de comienzo tardío, ya que los padres de los pacientes afectos podrían haber muerto hace mucho tiempo. Variantes de TDT utilizan hermanos para salvar este problema.

Encontrar la variante causal real

Si una asociación es replicada y los controles parecen satisfactorios, el siguiente paso es identificar el factor real de susceptibilidad. Como se mencionó anteriormente, la variante causal real no puede ser el SNP utilizado para establecer la asociación, sino algo en desequilibrio de ligamiento con él. En enfermedades mendelianas, la secuenciación de los genes candidatos suele revelar mutaciones convincentes. En las enfermedades complejas los factores de susceptibilidad pueden ser variantes mucho menos obvias, como en el caso de la persistencia de la

lactasa intestinal (*Cuadro 8.4*). Será necesario secuenciar el segmento ancestral del cromosoma completo de un gran número de casos y controles para buscar las diferencias. Pero las variantes irrelevantes que están presentes en los segmentos ancestrales tienden a encontrarse en todos los casos, y una simple comparación de secuencias de casos y controles no puede precisar el cambio relevante. Se necesitan algunos descubrimientos biológicos en la función, y es muy difícil saber por qué, por ejemplo, en el caso de la lactasa, un polimorfismo C/T 14 kb aguas arriba del codón de inicio debe tener algún efecto en la expresión del gen de la lactasa. Así, este obstáculo final es un reto mucho más significativo que en las enfermedades mendelianas.

Un recurso para los estudios de asociación: el proyecto HapMap

Considérese el patrón de la variación normal a lo largo del genoma humano. La mayoría de los nucleótidos son más o menos invariables, con sólo unas variantes ocasionales poco comunes, pero alrededor de 1 de cada 300 es polimórfico con dos variantes comunes en todas las poblaciones o en muchas de ellas. ¿Qué puede producir semejante patrón? No es que los nucleótidos variables tengan intrínsecamente más probabilidad de variar que los nucleótidos de su alrededor. Más bien, las diferentes variantes marcan segmentos cromosómicos ancestrales distintos. El nucleótido variable muta sólo una vez, por azar, en un antepasado remoto, y un número significativo de personas hereda la versión mutada, mientras que otros heredan la versión original.

El genotipado de SNP de alta densidad revela un cuadro fascinante. Si hay un SNP cada 300 pb, un segmento de 10 kb podría contener alrededor de 30 SNPs. Si cada uno tiene dos alelos, existen 230 haplotipos posibles. Sin embargo, para la mayoría de estos segmentos en todas las poblaciones humanas, se encuentran solo de 4 a 6 haplotipos distintos. Debe de ser la evidencia de segmentos ancestrales compartidos. Esto significa que para cualquier segmento en particular, todos los seres humanos tenemos solo entre 4 y 6 antecesores. Lo que no significa que todos descendamos de los mismos 4-6 cavernícolas. El siguiente segmento cromosómico derivará también sólo de 4 a 6 antecesores, pero serán diferentes de los anteriores.

El proyecto internacional HapMap aspira a definir los bloques de haplotipos conservados a través de varios grupos étnicos (ver www.hapmap.org/). Los resultados tras el tipado de un millón de SNPs confirman el cuadro de nuestros cromosomas como un mosaico de bloques ancestrales (*Figura 13.11*). Los bloques son entidades estadísticas, no características identificables con claridad del genoma. Como muestra la figura, la estructura del bloque es obvia, pero los límites exactos de los bloques no lo son: el número exacto, tamaño e identidad de los bloques depende de los criterios estadísticos adoptados. Los bloques varían en tamaño, con un promedio alrededor de 5-15 kb. Algunas regiones dispersas del genoma no tienen una estructura en bloque fácilmente identificable. Estas podrían ser regiones con alta recombinación, o regiones donde la conversión génica es frecuente. Pese a estas reservas, la identificación de bloques ancestrales es una característica clave en el diseño de los estudios de asociación.

Los bloques pueden estar definidos por el genotipo o quizá por dos o tres SNPs seleccionados ('SNPs marcadores'). Se puede comenzar imaginando la descripción de genoma de alguien mediante la utilización de SNPs marcadores para recopilar una lista de cuál de los 4-6 bloques alternativos está presente en cada localización cromosómica. La relevancia para mapear factores de susceptibilidad es que si se recopila semejante lista para cada persona afecta de la enfermedad elegida podríamos ser capaces, con bastante facilidad, de observar cuáles son los bloques ancestrales que comparten. Los bloques compartidos podrían ser candidatos para contener variantes antiguas comunes que confieren susceptibilidad a la enfermedad. Mientras el mapeo ASP define regiones compartidas de 20-50 Mb, demasiado grande para buscar variantes de secuencias, los bloques de haplotipos compartidos serán solo de una longitud de unas pocas kb y fáciles de encontrar.

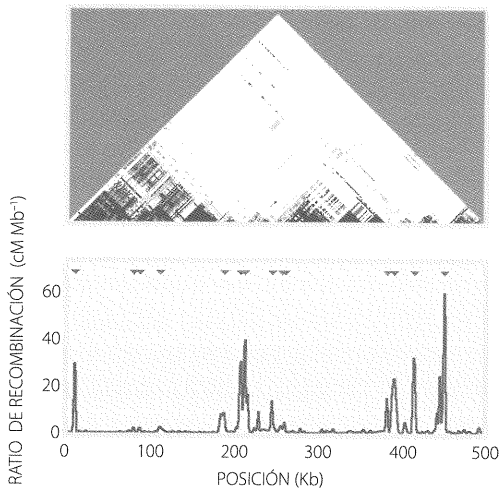


Figura 13.11 – Un ejemplo de estructura en bloque del haplotipo del genoma humano como revela el proyecto HapMap.
En el esquema triangular, un grupo ordenado de SNPs de una región de 500 kb de la región cromosómica 2q37 está reflejado en los ejes inclinados. Cuando hay un ligamiento en desequilibrio completo entre cualquier par de SNPs, el elemento de intersección está coloreado en rojo. El resultado se puede leer a lo largo del eje horizontal como un mapa de bloques de hablotipos a lo largo de esa región cromosómica. La figura de más abajo muestra la frecuencia de recombinación en la región. Aunque la media del genoma complete es 1 cM / Mb, casi toda la recombinación ocurre en unos pocos puntos calientes, marcados por triángulos rojos. Los puntos calientes de recombinación corresponden generalmente a límites de bloques de haplotipo. Adaptado de "The International HapMap Consortium (2005)", con permiso de Macmillan Publishers Ltd.

Un riesgo en los estudios de asociación: todo depende de la enfermedad común. Hipótesis de la variante común

La combinación de los datos del proyecto HapMap y las tecnologías de genotipado de gran capacidad contienen la promesa del progreso real en esta difícil área de investigación. Los mismos cálculos de Risch and Merikanga que mostraron la pobreza de los estudios ASP en la identificación de factores débiles de

susceptibilidad, demostraron que los estudios de asociación son más poderosos con tamaños de muestras más viables. Sin embargo, existe una diferencia importante entre ligamiento y asociación. El ligamiento es una relación entre loci, mientras que la asociación es una relación entre alelos o fenotipos (ver *Cuadro 13.2*). Si una colección de familias tiene mutaciones en el mismo gen, mostrarán ligamiento en marcadores cercanos. Esto es cierto, incluso si la mutación actual es diferente en cada familia, manteniendo el mismo locus. Pero la misma colección de familias no tendería a compartir el mismo alelo en un locus marcador a menos que todos tengan la misma mutación ancestral, en el mismo segmento cromosómico ancestral.

La **enfermedad común: la hipótesis de la variante común** sostiene que los factores más comunes de susceptibilidad a la enfermedad serán variantes ancestrales que son polimorfismos comunes en la población actual. Como se vio en los *Capítulos 5* y *6*, la mayoría de las enfermedades mendelianas muestran gran heterogeneidad alélica. Hay excepciones, pero la mayoría de ellas muestran una dispar colección de mutaciones relativamente recientes. Si ocurre lo mismo con los factores de susceptibilidad a las enfermedades comunes, toda la aproximación aquí descrita sería un fracaso. Se arguye que las mutaciones causantes de la enfermedad mendeliana tienen una rotación mucho mayor debido a que la selección natural constantemente las elimina y se mantienen por mutaciones recurrentes. Los factores de susceptibilidad no están afectados significativamente por la selección natural, así que persisten en la población como variantes ancestrales. El argumento es una extensión del utilizado en el Capítulo 10 para la lenta rotación de las mutaciones causantes de las enfermedades recesivas, comparado con el rápido recambio de las mutaciones causantes de las enfermedades dominantes. Es verosímil, pero sólo un trabajo más amplio nos dirá si es correcto.

Si podemos identificar factores de susceptibilidad, entonces ¿qué?

Hasta ahora se ha descrito un paquete de teorías científicas plausibles, pero ¿cuál es su utilidad práctica? Si la investigación tiene éxito, ¿cómo influirá la identificación de factores de susceptibilidad en el manejo que los clínicos harán a sus pacientes en 10 o 20 años? Y ¿existe algún otro valor en la investigación?

Una esperanza es que, si el conocimiento de los factores de susceptibilidad afecta a la práctica clínica, debería proporcionar pistas para la investigación farmacéutica. Identificar un nuevo factor de susceptibilidad para la diabetes identifica una nueva parte de la patogénesis, que puede ser utilizada como diana para nuevas terapéuticas. Hace veinte años el pequeño número de dianas conocidas era un factor limitante en el desarrollo de medicamentos. Actualmente las compañías farmacéuticas están abrumadas por el gran número de dianas posibles y su capacidad para darles prioridad se ha convertido en el factor más importante. La gran cantidad de tiempo necesario para desarrollar un medicamento significa que es demasiado pronto todavía para conocer si los estudios de susceptibilidad genética llevarán finalmente a nuevos medicamentos efectivos. Se debe de tener en cuenta que la mayoría de los beneficios de las compañías provienen de un pequeño número de medicamentos "blockbuster". Necesariamente estos son

medicamentos que se pueden prescribir a un gran número de personas. Para enfermedades comunes como la T2D las dianas más prometedoras deben residir en rutas comunes que están afectas en todos los pacientes. Pero estas ya están bien exploradas por la investigación en la fisiología de la enfermedad. Un factor de susceptibilidad importante solo para un 2% de los pacientes es un área muy poco atractiva para el desarrollo.

Con respecto a los posibles efectos en la práctica clínica, hay una gran división de opiniones. Para los optimistas, la medicina en el siglo XXI cambiará del modelo de diagnóstico y tratamiento al modelo de predicción y prevención. Nadie esperará a caer enfermo para consultar al médico. En cambio, a partir de una muestra de ADN serán cribados para un gran número de factores de susceptibilidad a la enfermedad. El ordenador identificará para qué enfermedades comunes estarán en riesgo y el médico les aconsejará cómo evitarlo.

Este punto de vista tiene el apoyo de muchos de los genetistas más eminentes. El *Cuadro 13.4* muestra un ejemplo de esta visión. Otros, igualmente eminentes, son menos optimistas sobre el salto del diagnóstico a la predicción y prevención, para ello. utilizan tres argumentos principales:

- La mayoría de las predicciones serán débiles comparadas con aquellas que se hacen basándose en la dieta, hábito de fumar, el ejercicio, etc. Si conocemos 20 factores de riesgo para una enfermedad, entonces una persona con los 20 de alto riesgo o los 20 de bajo riesgo tendrá una predicción muy acertada. Pero semejantes personas son muy raras. La mayoría de las personas tendrán alguna combinación de factores de alto y bajo riesgo, lo que no nos llevará a una predicción sólida. De esta forma, el punto de vista optimista sobrevalora los factores genéticos a expensas del conocimiento y de los factores de estilo de vida mas fácilmente manipulables (ver el ejemplo del T2D).
- El consejo acerca del estilo de vida te llevaría a no depender de la predicción; por ejemplo, nunca le dirías a una persona con factores de bajo riesgo para el cáncer de pulmón que puede fumar cuanto quiera sin preocuparse. La limitación del genotipado del estilo de vida se discutió en el *Capítulo 11*. Ya que la intervención no depende del resultado del análisis, ¿cuál es el beneficio de hacer el test? (Los optimistas responden que puedes aconsejar más sólidamente o recomendar más vigilancia y quizá medidas preventivas extra a cualquiera con alto riesgo, y saber que tiene un alto riesgo puede motivar a la persona a tomar más precauciones.)
- La predicción no lleva automáticamente a la prevención. A menudo no se sabe el significado de "prevención", incluso cuando la hay, es improbable que las personas sigan las recomendaciones a menos que la predicción sea extremadamente sólida y no implique inconvenientes o gastos. Tenemos excelentes predictores del cáncer de pulmón y de la T2D, y medidas preventivas altamente efectivas que son conocidas por todo el mundo y disponibles a coste cero; todavía estas enfermedades permanecen como un problema de salud pública principal. ¿Por qué deberían tener más éxito los predictores genéticos relativamente débiles?

Esperamos haber presentado aquí los dos lados de esta controversia. Los estudiantes de medicina actuales encontrarán cuál es la correcta.

Cuadro 13.4

Un caso hipotético en 2010

El texto siguiente ha sido tomado de 1999 Shattuck Lecture de Francis Collins, director del US National Human Genome Research Institute. Se reproduce aquí con permiso de Collins (1999). © 1999, Massachusetts Medical Society.

La visión general de la medicina basada en el gen en el futuro es útil, pero muchos profesionales de la salud, probablemente todavía se quiebran la cabeza pensando cómo afectará a la práctica diaria de la medicina en atención primaria. Aquí se describe un encuentro clínico hipotético en 2010.

John, un universitario de 23 años, es referido a su médico porque en un análisis médico requerido para un trabajo se ha detectado que su nivel sérico de colesterol es de 255 mg por decilitro. Él goza de buena salud, pero ha fumado durante seis años un paquete de cigarrillos diario. Ayudado de un programa de ordenador interactivo que toma la historia familiar de Jonh, su médico observa que tiene una historia paterna de infarto de miocardio y que su padre murió a los 48 años.

Para obtener información más precisa sobre sus riesgos de contraer una enfermedad coronaria y otras enfermedades, John accede a realizarse una batería de tests genéticos disponibles en 2010. Tras interactuar con un programa de ordenador interactivo que explica los beneficios y riesgos de los tests, John accede (y firma el consentimiento informado) a someterse a 15 análisis genéticos que proporcionan información del riesgo para enfermedades para las que están disponibles estrategias preventivas. Decide realizar también 10 tests adicionales que implican enfermedades para las cuales no existen intervenciones preventivas validadas todavía.

Se utiliza como muestra de ADN un frotis de su mucosa oral y los resultados tardan una semana (*Tabla 1*). La siguiente sesión de consejo de John con el médico y la enfermera especialistas en genética se centra en las enfermedades para las cuales su riesgo difiere sustancialmente (por un factor o más de uno) del de la población general. Como la mayoría de los pacientes, John está interesado en su riesgo relativo y en su riesgo absoluto.

John se alegra de saber que los análisis genéticos no siempre dan malas noticias; sus riesgos de contraer cáncer de próstata y Alzheimer son menores porque es portador de variantes de bajo riesgo de varios genes conocidos en 2010 que contribuyen al desarrollo de estas enfermedades. Pero John se hace consciente sobre la evidencia de sus riesgos incrementados de contraer una enfermedad arterial coronaria, cáncer de colon y de pulmón. Enfrentado a la realidad de sus datos genéticos, llega al momento crucial en el que aprende sobre conductas que actúan en la longevidad y están enfocadas en reducir, si es posible, sus factores de riesgo. Y hay mucho que ofrecer.

En 2010, el campo de la farmacogenómica se ha desarrollado, y una pauta profiláctica de medicamentos basado en el conocimiento de los datos genéticos personales de John puede ser prescrita precisamente para reducir su nivel de colesterol y su riesgo de enfermedad coronaria a niveles normales. Su alto riesgo de cáncer de colon puede ser dirigido iniciando un programa de colonoscopia anual a partir de los 45 años, lo que en su situación es un camino muy efectivo para evitar el cáncer de colon. Su riesgo sustancial de contraer cáncer de pulmón proporciona la motivación clave para unirse a un grupo de apoyo de personas de alto riesgo genético sobre graves complicaciones por fumar y poder abandonar el hábito.

Esta visión de la medicina preventiva individualizada basada en la genética es excitante y podría hacer una profunda contribución a la salud humana. Para que se pueda realizar, sin embargo, necesitará ser tomada en cuenta de manera firme la protección frente al mal uso de la información genética. Otro desafío debe ser encontrar médicos, enfermeras y otros profesionales de la salud familiarizados con los campos emergentes de la medicina genética. La necesidad de

especialistas en genética médica que puedan clasificar los casos más complejos será considerable, pero como no habrá suficientes, la genética médica será practicada en su mayor parte por los médicos de atención primaria. Numerosas encuestas han mostrado que actualmente no estamos preparados para ello; la mayoría de los facultativos de atención primaria no han tenido ni una hora de formación en genética como parte de su aprendizaje.

Para solucionar esta necesidad urgente de educación, el National Human Genome Research Institute, la American Medical Association y la American Nurses Association se han asociado recientemente para formar la National Coalition for Health Professional Education in Genetics (NCHPEG). NCHPEG (accesible en http://www.nchpeg.org) es un esfuerzo nacional para promover la educación profesional y el acceso a la información de los avances en genética humana. Un grupo interdisciplinar, NCHPEG, comprende a los líderes de aproximadamente 100 organizaciones de profesionales de la salud, consumidores y grupos voluntarios, agencias gubernamentales, industria privada, organizaciones de planificación sanitaria y sociedades profesionales de genética. Mediante la facilitación de una comunicación abierta y frecuente, NCHPEG busca aprovechar la pericia colectiva y la experiencia de sus miembros y reducir la duplicación de esfuerzos.

Tabla 1 – Resultados del análisis genético en un paciente hipotético en 2010.

Enfermedad	Genes implicados*	Riesgo relativo	Vida media del riesgo (%)
De bajo riesgo			
Cáncer de próstata	*HPCI, HPC2, HPC3*	0.4	7
Enfermedad de Alzheimer	*APOE, FAD3, XAD*	0.3	10
Alto riesgo			
Enfermedad de arteria coronaria	*APOB, CETP*	2.5	70
Cáncer de colon	*FCC4, APC*	4	23
Cáncer de pulmón	*NAT2*	6	40

**HPC1*, *HPC2* y *HPC3* son tres genes para el cáncer de próstata hereditario; *APOE* es el gen de la apolipoproteína *E*; *FAD3* y *XAD* son genes hipotéticos de la demencia familiar de Alzheimer; *APOB* es el gen de la apolipoproteína *B*; *CETP* es el gen de la proteína colesteril ester transferasa; *FCC4* es el gen hipotético del cáncer de colon familiar; *APC* es el gen de la poliposis adenomatosa, y *NAT2* es el gen de la *N*-acetil transferasa 2.

Autismo

Desde la primera descripción del autismo temprano infantil a principios de los cuarenta, el rango de enfermedades incluidas bajo la denominación de "trastornos de espectro autista" se ha ampliado. La estimación de la frecuencia varía ampliamente, pero para los tipos severos y moderados, se sitúa alrededor de 1 por cada 1000. Por definición, los niños con autismo deben manifestar retrasos en "la interacción social, el lenguaje utilizado para la comunicación social o juegos simbólicos o imaginativos" con "un comienzo anterior a los 3 años", según el Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales. Los niños con autismo clásico, que pueden presentar en ocasiones características regresivas alrededor de los 18 meses de edad, generalmente tienen problemas con:

- la interacción social, incluyendo un pobre contacto visual, fallo del desarrollo en sus relaciones sociales y en las actividades participativas.
- el desarrollo de la comunicación, incluyendo retraso o pérdida total del lenguaje hablado o utilización de lenguaje repetitivo y pérdida del juego imaginativo o de imitación.
- comportamiento inflexible con las rutinas, obsesiones y patrones de actividad repetitivos.

Mientras que los niños con autismo clásico normalmente requieren una educación especial y son dependientes durante toda su vida, aquellos individuos del espectro leve son a menudo diagnosticados en la infancia tardía o en la vida adulta y llevan vidas relativamente normales.

El autismo ilustra muchos de los problemas que rodean los análisis genéticos de los caracteres psiquiátricos y de comportamiento. Mientras que definiciones como las anteriores aseguran que los clínicos quieren decir lo mismo cuando utilizan la palabra "autismo", tales definiciones son arbitrarias y no describen necesariamente una entidad biológica. El autismo clásico va desde el síndrome de Asperger hasta variantes "normales" de la personalidad sin ningún límite natural (ver la figura). La razón sexual en el autismo clásico en múltiples estudios se sitúa alrededor de 4M : 1F, pero se acepta que es más probable que los niños "normales" pasen horas jugando obsesivamente y en solitario a la consola y sean socialmente incompetentes que lo hacen las niñas. Existen muchos trastornos citogenéticos y monogénicos donde el autismo o las características autistas son frecuentes, como por ejemplo el síndrome de Rett, el síndrome de X Frágil y las duplicaciones del cromosoma 15q11–13. Un pequeño porcentaje de los niños cuyo diagnóstico primario es autismo tienen una u otra de estas enfermedades, pero no la gran mayoría. Evidentemente el autismo es un patrón de comportamiento que puede tener muchas causas diferentes.



Los trastornos del espectro autista se funden con el comportamiento normal sin fronteras naturales.

Se han identificado factores no ambientales como causas principales de autismo. Los primeras publicaciones se refieren a crianza anormal, con "madres frigorífico", no se han confirmado en estudios mas cuidadosos y, a pesar de la publicidad que se ha realizado, no hay estudios serios que impliquen a la vacuna triple (sarampión, paperas, rubeola). Por el contrario, muchas observaciones apuntan a determinantes genéticos importantes. El riesgo de recurrencia en hermanos (tras el nacimiento de un niño con autismo clásico) es del 6-8%, así que λ_s es aproximadamente 50, entre las más altas para cualquier enfermedad compleja (compara con la *Tabla 13.1*). Para los parientes de segundo grado el riesgo es claramente menor, alrededor del 0,18%. La concordancia es mucho más alta entre gemelos monocigóticos que entre los dicigóticos (70–82% versus 0–10%, dependiendo del criterio utilizado). La disminución entre gemelos MZ y DZ, y entre los parientes de primer y segundo grado, está mucho más clara que en la mayoría de las enfermedades complejas. Esto podría ser por cualquiera de estas razones:

- la susceptibilidad genética podría depender de combinaciones de un insólito gran número de genes, 20 o más.
- la susceptibilidad podría ser debida a nuevas mutaciones; podrían ser cambios en la secuencia convencional o epimutaciones.

Sería bueno saber cuál de estas dos explicaciones es la correcta, porque tienen implicaciones diametralmente opuestas para la investigación del autismo. La primera significaría que sería necesario que los estudios se hicieran a gran escala (caros) para detectar asociaciones. La segunda implica que el abordaje de asociación no funcionaría; la mejor aproximación sería la secuenciación (incluyendo la secuenciación con bisulfito) de genes candidatos en un panel de individuos afectos.

La investigación genética hasta ahora ha seguido las rutas de costumbre. Se han publicado doce exámenes del genoma completo entre 1998 y 2004. Utilizando el criterio de Lander–Kruglyak (*Cuadro 13.3*) no se han observado *lod scores* significativos; solo uno, 3,74 para el cromosoma 2q.

Otros estudios apoyan *lods* sugestivos en 2q. Otras localizaciones sugestivas son 7q, 16p y 17q. Diferentes estudios han publicado *lods* sugestivos para loci dispersos en otros cromosomas, pero estos, rara vez, han sido reproducidos, incluso mediante ligeros incrementos de *lod scores*. Los genes candidatos para los estudios de asociación han sido elegidos por su localización cromosómica y/o probabilidad de implicación en la neurotransmisión. Se han publicado varias asociaciones, pero los estudios de replicación han sido inconsistentes o negativos. En unos pocos individuos se han encontrado mutaciones en uno u otro gen, pero ningún polimorfismo ha mostrado todavía una asociación consistente o ha sido identificado como un factor principal en autismo.

Investigar fenotipos psiquiátricos y de comportamiento implica los mismos problemas que investigar cualquier enfermedad compleja, pero con la dificultad añadida de que las etiquetas diagnósticas son arbitrarias. El autismo es típico: la palabra describe un tipo de comportamiento que puede tener toda clase de causas diferentes en casos individuales diferentes. Los investigadores tratan de definir "endofenotipos" para señalar grupos más homogéneos; esto es, caracteres que formen parte del conjunto de todos los fenotipos pero que puedan encontrarse próximos a la acción del gen. La elección de los endofenotipos posibles es amplia, haciendo más difíciles los estudios de confirmación y el metaanálisis. Mientras, es importante investigar la posibilidad, en los casos individuales, de una causa conocida monogénica o citogenética, dibujando un árbol genealógico familiar detallado, señalando los casos de trastornos de espectro autista, y así obtener los riesgos de recurrencia basándonos en los datos empíricos.

Para información sobre autismo consulte http://www.nimh.nih.gov/publicat/autism.cfm. Las páginas web de los grupos de apoyo de EE UU y GB son http://www.nas.org.uk/ y http://www.autism-society.org.

13.5. Referencias

American College of Medical Genetics/American Society of Human Genetics Working Group on APOE and Alzheimer disease (1995) Statement on use of apolipoprotein E testing for Alzheimer disease. *JAMA*, **274**: 1627–1629.

Bertram L y Tanzi RE (2004) The current state of Alzheimer's disease genetics: what do we tell the patients? *Pharmacol. Res.* **50**: 385–396.

Eckel RH, Grundy SM y Zimmet PZ (2005) The metabolic syndrome. *Lancet*, **365**: 1415–1428.

Florez JC, Hirshhorn J y Altshuler D (2003) The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **4**: 257–291.

Holzman NA (1999) Promoting safe and effective genetic tests in the United States: work of the task force on genetic testing. *Clin. Chem.* **45**: 732–738.

The International HapMap Consortium (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature*, **437**: 1299–1320.

Lander E y Kruglyak L (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat. Genet.* **11**: 241–247.

Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES y Hirschhorn JN (2003) Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat. Genet.* **33**: 177–182.

Risch N y Merikangas K (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*, **273**: 1516–1517.

Stumvoll M, Goldstein BJ y van Haeften TW (2005) Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*, **365**: 1333–1346.

Warren V (1999) *Report of Work Group on Genetic Tests and Future Need for Long-Term Care in the UK*. Continuing Care Conference, London.

13.6. Ejercicios de autoevaluación

(1) ¿Cuál de las siguientes proporcionaría mayor evidencia de la implicación de factores genéticos en la susceptibilidad a ataques de corazón?
   (a) Una incidencia incrementada de ataques de corazón entre los hermanos de los casos índice.
   (b) Una concordancia incrementada en el mismo sexo comparada con el sexo opuesto en parejas de gemelos.
   (c) Para casos índice adoptados, una incidencia incrementada en sus parientes biológicos, pero no en los adoptivos.
   (d) La observación de que los niños tienden a parecerse a sus padres en sus hábitos alimentarios, sanos o no.

(2) Dos mujeres no relacionadas padecen una enfermedad compleja en la que la familia, los gemelos y los datos de adopción sugieren que la susceptibilidad genética es importante. La enfermedad es dos veces más común en hombres que en mujeres. Anne es la única persona afecta en su familia; el hermano de Betty y su hijo también son afectos. Para cada una de las siguientes comparaciones, decida si el riesgo es:
(a) mayor
(b) menor
(c) el mismo
(d) imposible de predecir

(1) El riesgo de que el próximo hijo de Anne o Betty sea afecto, comparado con el riesgo de la descendencia de un hombre afecto.
(2) El riesgo de que un hijo de Anne sea afecto, comparado con el riesgo de que lo sea una hija suya.
(3) El riesgo de que un hijo de Betty sea afecto, comparado con el riesgo de que lo sea una hija suya.
(4) El riesgo de que el próximo hijo de Anne sea afecto, comparado con el riesgo del próximo hijo de Betty.

(3) Surge una mutación en un cromosoma que contiene un haplotipo determinado de marcadores. ¿Cuál sería la vida media (en generaciones) de la asociación entre las mutaciones y un marcador localizado a (a) 1 cM y (b) 5 cM de distancia?

(4) En la década de los cincuenta, Ronald Fisher sostenía que el conocimiento de la asociación entre el tabaco y el cáncer de pulmón no significaba que fumar causara cáncer de pulmón. Sugirió que el cáncer de pulmón incipiente producía una irritación en los pulmones que llevaba a las personas a fumar; o, por otro lado, que las personas con una cierta constitución nerviosa tenían tendencia a desarrollar cáncer de pulmón e, independientemente, a fumar. ¿Cómo probaría su error?

(5) El locus A tiene tres alelos, A*1, A*2 y A*3 con frecuencias génicas de 0,5, 0,4 y 0,1, respectivamente. El locus ligado B tiene tres alelos B*1, B*2 y B*3 con frecuencias génicas de 0,6, 0,3 y 0,1 respectivamente. ¿Cuál de las siguientes sería la evidencia de desequilibrio de ligamiento?
(a) La frecuencia del haplotipo A*1, B*1 es 0,30.
(b) La frecuencia del haplotipo A*2, B*2 es 0,14.
(c) La frecuencia del haplotipo A*3, B*3 es 0,03.
(d) La frecuencia del haplotipo A*3, B*2 es 0,01.

(6) ¿Cuál de las siguientes proposiciones es una evidencia del desequilibrio de ligamiento entre la fibrosis quística y el polimorfismo de ligamiento *KM19*?
(a) En una comparación de 10 poblaciones, la única con la mayor prevalencia de CF es también la que tiene mayor frecuencia de alelo 2 *KM19*.
(b) El alelo 2 *KM19* se encuentra en el 91% de los cromosomas 7 que tienen CF, pero solo en el 25% de aquellos que no son portadores de CF.
(c) Ambos loci, *CFTR* y *KM19*, se localizan en 7q31.2.
(d) En estudios familiares, los loci *CFTR* y *KM19* muestran un estrecho ligamiento.

(7) En una bolsa de judías con un gran número de judías negras, una de cada 100 es roja. Con los ojos cerrados, coja una judía. Si tiene diez oportunidades, ¿cuál es la posibilidad de que saque al menos una judía roja? Ahora aplique este argumento a la búsqueda de genes de susceptibilidad. Analice 1000 marcadores, cada uno con 4 alelos, para estudiar su asociación con la enfermedad de interés. ¿Qué valor de P para una asociación será significativo al nivel del 5%? ¿Obtendría la misma respuesta si en lugar de analizar asociación, analizara para ligamiento 1000 marcadores distribuidos a lo largo del genoma?

(8) El desarrollo del genotipado de gran capacidad ha hecho factible el análisis de asociación del conjunto del genoma. Se han analizado un millón de SNPs en un panel de 500 personas afectas y 500 controles. SNP 629 380 tiene dos alelos que están presentes con frecuencias del 50% cada uno en los controles. ¿Cuál es el umbral de personas afectas que deben tener el alelo 1 SNP para demostrar una asociación significativa con la enfermedad?

(9) En un locus de susceptibilidad a una enfermedad el riesgo relativo de enfermedad para los genotipos 1–1, 2–1 y 2–2 es 4:2:1. Calcule la proporción esperada de parejas de hermanos afectos si ambos son 1–1, o ambos 2–1 o uno de cada 1–1 y 2–1 si los padres son:
(a) 1–1 × 2–2
(b) 1–1 × 2-1

Capítulo **14**

¿Qué podemos hacer con una enfermedad genética?

Conceptos y habilidades que aprenderá en este capítulo

Después de estudiar este capítulo será capaz de:

- Describir el valor del diagnóstico y consejo para los pacientes y sus padres.
- Estimar el riesgo de recurrencia en enfermedades mendelianas y algunas multifactoriales en familias afectadas (en casos sencillos).
- Describir los principales métodos de diagnóstico prenatal, sus usos y problemas.
- Describir el uso de manipulación de dieta para tratar enfermedades genéticas.
- Describir a grandes rasgos los principios de la terapia génica por aumento de genes, reemplazamiento de genes, uso de genes diana y manipulación de *splicing* alternativo y su estado general en la práctica clínica actual.
- Describir las posibles aplicaciones de las células madre en el tratamiento de las enfermedades genéticas.

14.1. Historias clínicas

No hay casos nuevos en este capítulo, por lo que se discutirá sobre los casos previos empleados en este libro.

14.2. Antecedentes

Los cuidados médicos en genética clínica, como en la mayoría de las especialidades médicas, necesitan un diagnóstico preciso. Las principales intervenciones en genética clínica implican consejo, análisis y terapia.

Diagnóstico

Como ilustran los casos descritos en el texto, el examen y las observaciones clínicas son el principal paso para establecer un diagnóstico. Muchos clínicos y otros profesionales de la salud están implicados en el diagnóstico y en el consejo de individuos y familiares con enfermedades genéticas. En los países con buen desarrollo de los servicios de salud, se han creado centros especializados en genética y están dirigidos por genetistas clínicos, consejeros genéticos e investigadores genéticos. Las enfermedades genéticas pueden afectar a grupos de población de todas las edades y a todos los sistemas del cuerpo, además de que los especialistas necesitan tener amplias habilidades, si bien la subespecialización significa que los genetistas clínicos se hagan expertos en áreas específicas.

Un diagnóstico se establece haciendo una historia médica del embarazo y familiar detallada, seguida de un examen sistemático, y después realizando las investigaciones apropiadas. En algunos síndromes (p. ej., el síndrome de Williams, acondroplasia), el diagnóstico se sospecha primero por el patrón de la cara y otras características como malformaciones cardiacas o medidas del cuerpo. En otras enfermedades (p. ej., neurológicas o enfermedades metabólicas), el diagnóstico se sospecha por los síntomas clínicos y por el examen de los sistemas corporales. El diagnóstico diferencial posterior puede realizarse mediante tests específicos, si están disponibles. Muchas enfermedades genéticas aún siguen confiando en el diagnóstico clínico porque no hay disponibles tests genéticos.

Un diagnóstico facilita el manejo clínico, se anticipa a las complicaciones y en unas pocas condiciones realiza el tratamiento. Un consejo genético adecuado precisa de un diagnóstico exacto; si la causa establecida es mendeliana o citogenética, después el consejo es relativamente sencillo, pero en muchas situaciones, como retraso en el aprendizaje o síndromes malformativos, no conformes a un patrón previamente descrito y donde los tests son negativos, el consejo es menos preciso y están basados en estudios de grupos similares de familias afectadas.

Evaluación del riesgo y consejo genético

El consejo genético implica mucho más que dar un riesgo de recurrencia, pero un comienzo necesario es obtener un riesgo de recurrencia correcto. Aquellos que calculan los riesgos necesitan tener suficientes conocimientos de la ciencia y el método para el cálculo del riesgo, estar capacitados para justificar una cifra establecida, si no la han calculado ellos mismos.

- En las enfermedades mendelianas el aumento de la disponibilidad y el éxito de los tests de mutaciones han hecho que el consejo sea mucho más fácil que en la pasada década. Cuando los riesgos están basados solo en el árbol genealógico, la principal dificultad con las enfermedades graves dominantes y ligadas al X en las que las nuevas mutaciones son frecuentes. En estos casos los métodos bayesianos son importantes herramientas (ver *Tabla 14.1*). Los consejeros (incluyendo los clínicos que ofrecen consejos) necesitan tener los suficientes conocimientos de los métodos bayesianos y ser capaces de seguir y justificar el cálculo, sean o no ellos mismos quienes hacen el cálculo.
- En enfermedades cromosómicas como las trisomías, el riesgo de recurrencia es de tipo empírico. Cuando los padres son portadores de una anomalía equilibrada (como en el Caso 5 con Ellen Elliot) los citogenéticas deberán ser consultados acerca del riesgo desequilibrado en la descendencia. Aunque cada caso es único, los citogenetistas pueden dar una guía basada en la geometría del emparejamiento meiótico, por ejemplo, el tetravalente en un portador de una traslocación recíproca.
- En enfermedades complejas los riesgos son empíricos. El punto más importante es utilizar datos que estén actualizados (los riesgos cambian en circunstancias cambiantes) y relacionados con el grupo étnico apropiado.

El consejo genético es esencialmente un proceso informativo y de comunicación. La definición ampliamente aceptada de consejo genético (American Society of Human Genetics, 1975) establece que es:

> *"un proceso de comunicación que trata con problemas humanos asociados con la incidencia, o el riesgo de ocurrencia de una enfermedad genética en una familia. Este proceso implica una atención por una o más personas especializadas y entrenadas para ayudar al individuo o a la familia en:*
>
> *(1) comprender los hecho médicos, incluyendo el diagnóstico, probable evolución de la enfermedad y posible manejo;*
> *(2) apreciar la forma en que la herencia contribuye a la enfermedad, y el riesgo de recurrencia en determinados familiares;*
> *(3) entender las alternativas para resolver el riesgo de recurrencia;*
> *(4) elegir el curso de las acciones que parecen ser apropiadas en vista de sus riesgos, sus metas familiares y sus creencias éticas y religiosas, y actuar de acuerdo con su decisión, y*
> *(5) hacer en un miembro afectado la mejor adaptación posible a la enfermedad y/o al riesgo de recurrencia de esta enfermedad."*

Cuadro 14.1

Una introducción al cálculo bayesiano en genética

Este método de combinar probabilidades fue inventado en el siglo XVIII por el reverendo Thomas Bayes. Ha resultado ser muy útil para el cálculo de los riesgos genéticos. Comienza con una **probabilidad previa:** ¿cuánto de probable es una hipótesis en primer lugar? Después permite poner en relevancia una evidencia que apoye o que esté en contra de la hipótesis (probabilidad condicional) y combinar ambas para obtener la probabilidad posterior.

Para aplicar este método:

(1) Poner cada posible hipótesis, excluyentes entre sí, que esté analizando. Tener en cuenta todas las probabilidades de que cada una de tus alternativas pueda ser verdad. Habitualmente hay dos alternativas: el individuo X es o no es portador de la enfermedad: pero a veces hay más (debe calcular las probabilidades de que X sea aa, Aa o AA).
(2) Asignar una probabilidad previa a cada una. En genética habitualmente son probabilidades mendelianas: 1 en 2, 1 en 4, etc. Deben sumar 1.
(3) Considerando sus primeras evidencias, para cada alternativa, escriba la probabilidad de haber hecho esa observación si esa alternativa fuera la verdadera. Estas son las probabilidades condicionales. No tienen por qué sumar 1 necesariamente.
(4) Si hay otras observaciones relevantes que son totalmente independientes de la primera, repita el paso 3 para cada observación.
(5) Cuando la lista esté completa, multiplique las cifras de cada columna de la tabla. El resultado se denomina "probabilidad conjunta".
(6) Como la probabilidad final para cada hipótesis posible debe sumar en conjunto 1 (p. ej., una de ellas debe ser la cierta), debe de equilibrar las probabilidades para que sumen 1. Hágalo dividiendo cada una por la suma de todas las probabilidades conjuntas. El resultado es la probabilidad final de cada hipótesis, teniendo en cuenta la probabilidad previa y todas las observaciones adicionales.

Para ilustrarlo, esta es la forma de calcular el riesgo de que sea portadora una hermana sana de un niño con fibrosis. Los diferentes pasos tienen un código de colores.

Cuadro 14.1 - Continuación

Hipótesis – la hermana es:	AA	Aa	aa
Probabilidad previa:	¼	½	¼
Condicional: no está afectada:	1	1	0
Probabilidad conjunta	¼	½	0
Probabilidad final	¼ / (¼+½+0) = ⅓	½ / (¼+½+0) = ⅔	0

1. Establezca las alternativas. Como hija de dos padres portadores, ella puede ser AA, Aa o aa.
2. La probabilidad previa es mendeliana 1:2:1.
3. Este es el truco. Recuerde que cada probabilidad condicional es la de la observación, teniendo en cuenta que esa hipótesis sea la verdadera. Si ella es AA, estará definitivamente sana (probabilidad=1). Igualmente si es Aa. Si es aa, no es posible que esté sana (obviamente aquí puede introducir variables de penetrancia, que es uno de los principales usos de este método).
4. Multiplique cada columna.
5. Divida cada probabilidad conjunta por la suma de todas las probabilidades conjuntas, para hacer que sumen 1.

La guía de los ejercicios de autoevaluación de este capítulo da más ejemplos y discusiones del cálculo de Bayes. El enfoque bayesiano a las cuestiones de probabilidad es atractiva, ya que se corresponde con la forma en que decidimos si creemos o no en algo cotidiano. Como se menciona en la guía para el ejercicio 1 del *Capítulo 9*, puede creer si su amigo le dice que no ha ido a una conferencia porque tenía sueño, pero no si le dice que fue porque había sido abducido por extraterrestres. Evalúe todo lo creíble de su historia teniendo en cuenta la probabilidad previa. De esta forma el cálculo bayesiano es una forma de sentido común cuantitativo.

Análisis

Como otros clínicos, un genetista solicitará un gran número de análisis, muchos de los cuales no son específicamente genéticos. Hacer un diagnóstico puede implicar todas las herramientas y tests clínicos usuales. Aquí nos referimos específicamente a los tests genéticos.

Tests diagnósticos

Pueden ser análisis cromosómicos, bioquímicos y de ADN.

- El *análisis cromosómico* está indicado en niños con múltiples malformaciones congénitas, en pacientes de cierta edad con una combinación de retraso mental y dismorfología, y en infertilidades inexplicadas de otra manera, abortos de repetición o estados intersexuales. *Capítulo 2*.
- El *análisis bioquímico* está indicado cuando aparecen ciertos síntomas e indicios, tal como hígado y bazo aumentado, convulsiones de comienzo temprano, deterioro neurológico y rasgos faciales toscos.
- Los *tests moleculares* son útiles cuando hay una fuerte sospecha, pero no certeza, de una enfermedad mendeliana determinada. Como se explicó en la *Sección 5.4*, los tests deben dirigirse, idealmente, a una mutación determinada, pero al menos en uno o dos genes específicos.

En general, los tests diagnósticos no tienen las mismas consecuencias éticas que los tests predictivos, pero los clínicos necesitan sensibilizarse sobre las posibles implicaciones para otros miembros de la familia.

Análisis de portadores

Se usa en enfermedades autosómicas y recesivas ligadas al X, y también para anomalías cromosómicas equilibradas. Normalmente debe llevarse a cabo tras la solicitud del paciente, y por una razón mas allá de la mera curiosidad. El consejo debería siempre formar parte de este proceso, aunque previo al test es de menor importancia. Los niños no deberían ser analizados, ni siquiera cuando hubiera un beneficio inmediato para ellos.

Análisis predictivos

Se emplean en las enfermedades de comienzo tardío, como la enfermedad de Huntington y el cáncer familiar. Necesita realizarse dentro del contexto de un servicio de genética completo y seguir los protocolos escritos que definen por adelantado la respuesta a cada uno de los posibles resultados. La *Tabla 14.2* muestra un protocolo para un test predictivo de la enfermedad de Huntington.

Test prenatal

Se pueden realizar en diferentes etapas del embarazo.

- La *biopsia de vellosidad corial* se realiza en la semana 10-12 de la gestación bajo el control ecográfico (*Figura 14.1*). Cualquiera de las dos rutas, transabdominal o transcervical, puede ser utilizada. El corion es la más externa de las membranas fetales; el instrumental para la muestra debería no penetrar en la cavidad amniótica. Una vez extraído, el material necesita una disección experta bajo el microscopio para recoger el material fetal libre de contaminación de tejido materno. Las vellosidades pueden

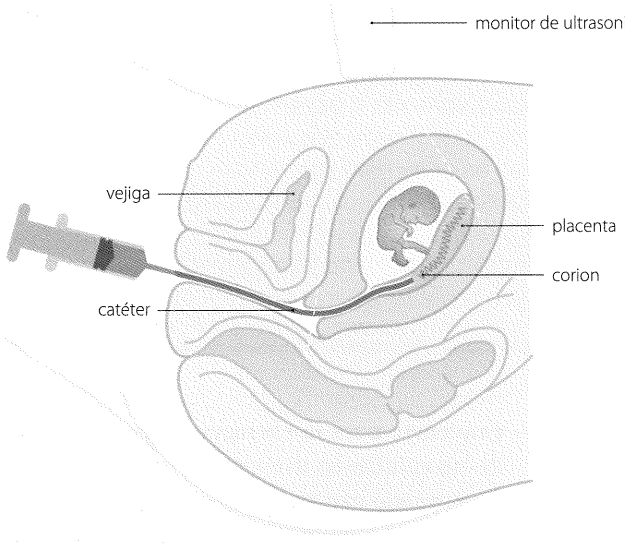


Figura 14.1 – Biopsia de vellosidad corial.

Cuadro 14.2

Protocolo para el test predictivo de la enfermedad de Huntington

Varias nacionalidades acordaron protocolos que requieren múltiples sesiones de consejo. El siguiente, reproducido de Tibben (2002) con permiso de Oxford University Press, es típico. El paciente es animado a que acuda a cada sesión con su esposa, amigo o quien le apoye.

Sesión de consejo 1:

Detalles sociodemográficos.
Confirmación de los datos familiares y clínicos.
Evaluación del impacto de la enfermedad de Huntington y de los resultados del test.
Evaluación del conocimiento de la enfermedad de Huntington y del test predictivo.
Razones para pedir la predicción.
Examen neurológico.

Sesión de consejo 2 (un mes o más después de la sesión 1):

Evaluación de los recursos psicológicos, personales y sociales usando los instrumentos estandarizados.
Más consejos y discusión de la sesión en la que se revelen los resultados; acuerdo en la fecha de esta sesión.
Nominación del profesional de apoyo.
Firma del consentimiento informado.
Toma de la muestra de sangre.

Trabajo de laboratorio:

La muestra de sangre se divide en dos y se envía al laboratorio en dos días diferentes, para minimizar cualquier riesgo de mezcla de muestras.
El laboratorio usa la PCR para estimar el tamaño de las repeticiones de CAG en ambas copias del cromosoma 4, como en la *Figura 4.18*.

Sesión de consejo 3 (al cabo de 2 semanas de la sesión 2):

Revelación de los resultados del test

Seguimiento 1:

2 días – 1 semana, normalmente por teléfono

Seguimiento 2:

3 meses

Seguimiento 3:

12 meses

Solo una pequeña proporción de personas con riesgo se hacen el test predictivo. El seguimiento de apoyo es importante tanto para quienes el test es negativo, como para los que son portadores del alelo de la enfermedad. Los centros genéticos suelen mantener un registro de familias con la enfermedad de Huntington (y otras enfermedades en las que el riesgo se extiende más allá del núcleo familiar). Ello proporciona un contacto puntual o a largo plazo de los miembros de las familias. Por ejemplo, en Manchester, 1374 individuos en riesgo en 514 extensas familias de enfermedad de Huntington tienen voluntarios incluidos en el registro, y cada uno contacta una vez al año para comprobar si hay algún problema y avisarlos de algún hallazgo nuevo relevante.

emplearse para la extracción de ADN o para análisis rápidos citogenéticos de las células en división presentes. Cualquier cultivo corto necesita ser confirmado con cultivos largos. Los mosaicismos detectados en vellosidad son difíciles de interpretar: es habitual saber, de forma retrospectiva, que

están confinados a la placenta. Para analizar el ADN, los resultados deberían compararse siempre con una muestra control de sangre materna, para asegurarse de que los resultados del test reflejan el genotipo fetal.

La biopsia de vellosidad corial conlleva un riesgo de aborto de alrededor del 2%. Hay una curva de aprendizaje del procedimiento significativa, y siempre es mejor elegir un obstetra que haya realizado muchas veces esta técnica.

- La *amniocentesis* se efectúa en la semana 14-20 de gestación (*Figura 14.2*). El líquido amniótico consiste principalmente en orina fetal y líquido de los pulmones. Pueden ser analizado bioquímicamente, o las células fetales pueden ser aisladas y cultivadas para análisis citogenéticos y moleculares. Los análisis bioquímicos incluyen test para la AFP, una proteína producida por el hígado fetal: un nivel elevado indica que el feto tiene una abertura; lo más probable un defecto del tubo neural, pero también puede ser un defecto de la pared abdominal. Hay mucha literatura sobre las interpretaciones de los hallazgos bioquímicos. El cultivo de células de líquido amniótico para el análisis citogenético tarda alrededor de dos semanas en obtener preparaciones de buena calidad. El líquido amniótico es una fuente de ADN mas pobre que la vellosidad corial porque hay menos células. Las nuevas técnicas que no requieren cultivos celulares, tal como la QF-PCR (PCR cuantitativa con cebadores marcados con fluorescencia) para detectar trisomías específicas, están empezando a introducirse de forma progresiva.

  La amniocentesis conlleva un riesgo de causar aborto del 0,5% al 1,0%.

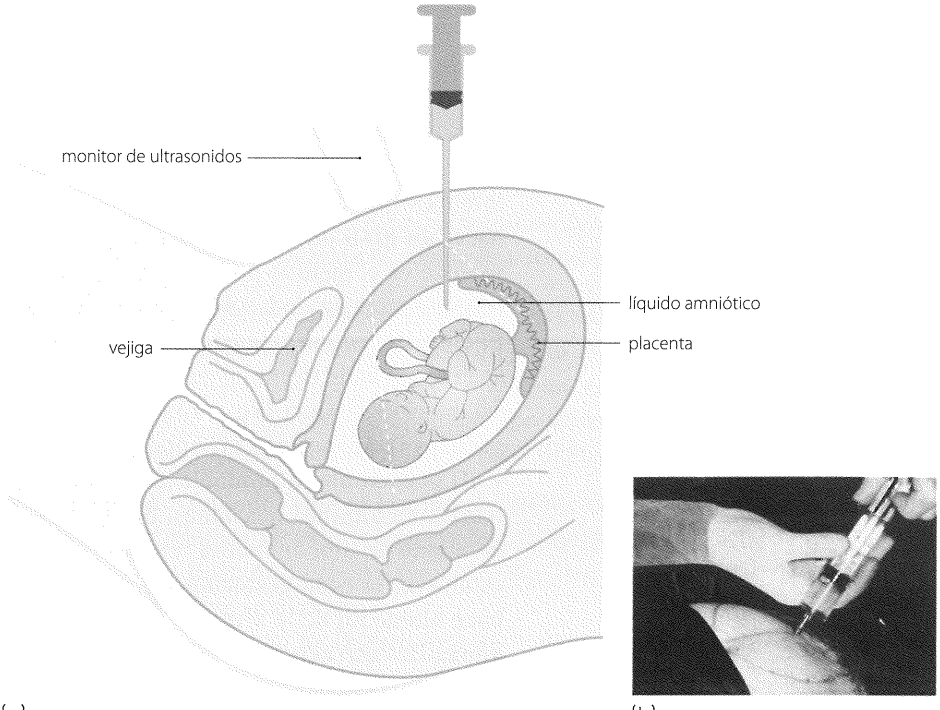


Figura 14.2 – Amniocentesis.
(a) Diagrama del procedimiento. (b) Extracción del líquido amniótico.

- *El análisis de células fetales en sangre materna* se ha sugerido a menudo como un método no invasivo de diagnóstico prenatal. Muchos artículos han mostrado que las células fetales se detectan con frecuencia en la sangre materna. Normalmente hay alrededor de una célula fetal por mililitro de sangre materna. Estas células poco habituales podrían ser utilizadas para detectar una larga lista de anomalías, pero los tests todavía no son lo bastante fiables. Un gran estudio multicéntrico (Estudio NIFTY, Bianchi *et al.*, 2002) intentó determinar el sexo y buscar aneuploidías mediante FISH en células fetales en interfase en 3502 muestras de sangre materna. Entre las mujeres embarazadas de un único feto masculino, al menos una célula con una señal de FISH de X y de Y se vio en el 41% de los casos; la tasa de falsos positivos fue del 11%. En aneuploidías la tasa de detección fue del 74% con 0,6% al 4,1% de falsos positivos.

  Debido a estos resultados controvertidos, la atención se ha centrado en la detección de ADN libre fetal en la circulación materna. El plasma de las mujeres embarazadas contiene ADN libre, del que el 3% al 6% es de origen fetal. La concentración de ADN libre es mucho mayor que la cantidad contenida en una célula fetal poco frecuente. El ADN fetal es detectable desde la semana 7, quizás antes, y su concentración aumenta durante el embarazo. El ADN fetal consiste principalmente en fragmentos de <220 pb de longitud. Su origen es desconocido, pero lo mas probable es que sea la placenta (en este caso los mosaicismos confinados a la placenta podrían ser un problema, como con la biopsia de la vellosidad corial).

  Protocolos de PCR altamente sensibles se han empleado para conocer el sexo del ADN fetal o para determinar mutaciones heredadas del padre. Muchos artículos atestiguan la viabilidad del genotipado fetal usando este ADN fetal libre (revisado por Chiu y Lo, 2004). Como ocurre con las dificultades de las nuevas tecnologías, los primeros artículos son de personas que han elegido este método para trabajar; aquellos que lo intentaron y fallaron rara vez publican sus experimentos. Habrá que hacer un gran número de ensayos controlados para descubrir cómo de robusto es el método para su uso en rutina en centros no especializados o con muestras enviadas desde otros hospitales, pero el método promete.
- *El diagnóstico por imagen* se discute aquí porque cuando una anomalía se detecta suele terminar en un test genético. Este es el único método establecido no invasivo para los estudios rutinarios fetales. Cada año que pasa las imágenes son más poderosas y sofisticadas. Las imágenes en 3D y 4D pueden ahora producir imágenes realmente claras de la estructura fetal y, en algunas ocasiones, de las características faciales. Una examen detallado de una anomalía fetal (diferente del examen empleado para establecer la edad gestacional y chequear el número de bolsas) se hace alrededor de la semana 18. Se puede detectar un amplio rango de anomalías estructurales que después serán investigadas, con frecuencia por amniocentesis seguida de cultivo celular y análisis cromosómico, o por análisis de enfermedades específicas por FISH. Por ejemplo, después de la detección de una anomalía cardíaca, se debe realizar un estudio de FISH para la deleción 22q11. El diagnóstico por imagen se emplea

también como cribado para detectar microsignos del síndrome de Down; el signo más buscado es el aumento de la traslucencia nucal, pero otras características estructurales como la ausencia de hueso nasal pueden incrementar la probabilidad de que el niño tenga un síndrome de Down.

Tratamiento

Aquí discutiremos las bases de dos grandes esperanzas para el progreso general en el tratamiento de enfermedades genéticas: la terapia génica y la terapia celular. Antes de introducirnos en ello, es importante insistir en que, mientras que las promesas de estas tecnologías estarán disponibles en un futuro, ya hay muchas que pueden hacerse aquí y ahora. La reputación de que las enfermedades genéticas con incurables solo es merecida parcialmente. Los pacientes genéticos, como los demás, tienen problemas y síntomas que pueden ser aliviados en algunas ocasiones si no es posible la cura radical. Los tratamientos específicos basados en el entendimiento de la función anormal están disponibles para un número de enfermedades. Se han dado varios ejemplos en la *Sección 14.3*, y en la *Tabla 14.2* y al final de este capítulo se numeran otros.

Terapia génica

La promesa de la terapia génica se apoya en la existencia de métodos de laboratorio bien establecidos para introducir genes dentro de las células. Es sorprendentemente fácil introducir ADN exógeno dentro de una célula viva en el laboratorio, usando un grupo amplio de técnicas (*Figura 14.3*). De forma general, se clasifican en métodos físicos y en métodos dependientes de vectores.

Los métodos físicos incluyen:

- *liposomas*: vesículas artificiales de unión a membranas que pueden fusionarse con membranas celulares y liberar su contenido dentro de la célula;
- *método mediado por receptores,* donde el ADN se pega a un ligando de un receptor de la superficie celular que le introduce después de unirse al ligando;
- *electroporación,* en el que un pequeño pulso de alto voltaje altera temporalmente la membrana celular de forma que toma el ADN desnudo del medio.

Los métodos basados en vectores usan virus diseñados que se asemejan a la trasformación aguda de retrovirus descrita en la *Figura 12.4*. Comparado con los métodos físicos, estos son mucho más eficientes en introducir ADN extraño en buena proporción en la célula diana. Muchos virus diferentes han sido empleados. Los factores que influyen en la elección incluyen:

- *capacidad*: cómo de larga es la pieza de material genético que puede llevar;
- *tropismo*: muchos virus infectan preferentemente ciertos tipos de células;
- *facilidad de infectar a células que no se dividen*: los retrovirus solo infectan a las células que se dividen
- *vectores integrantes o no integrantes*: los vectores integrantes semejantes a los retrovirus trasfieren el gen dentro del cromosoma de la célula huésped, asegurándose de que todas las células hijas llevarán una copia. Los vectores no integrantes, como los adenovirus, quedan como episomas extracromosómicos, que eventualmente desaparecerán durante la replicación celular.

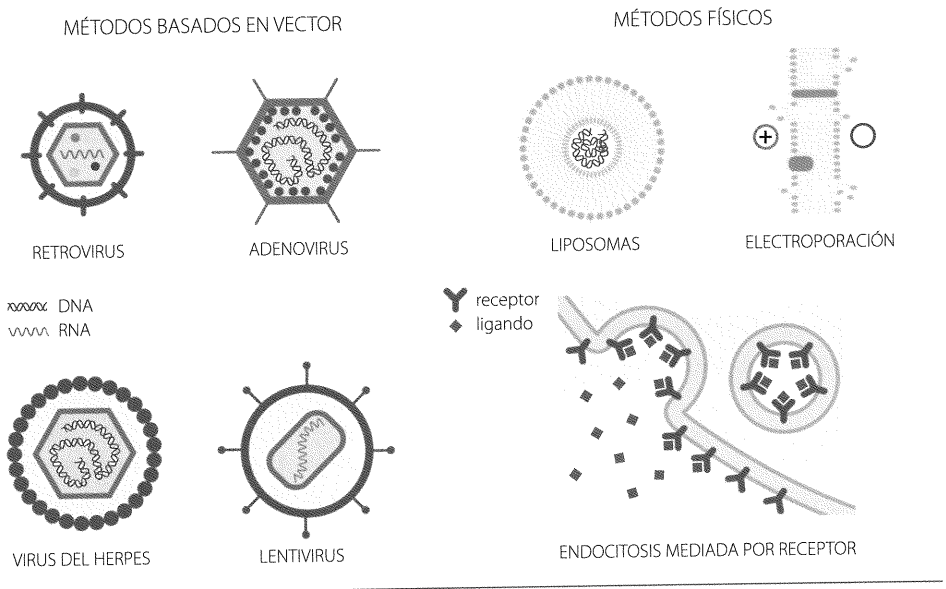


Figura 14.3 – Métodos de inserción de un gen exógeno dentro de la célula.

Como veremos en el caso de la familia Portillo (Caso 16, inmunodeficiencia) hay ventajas y desventajas en la integración.

Dependiendo de la naturaleza de la enfermedad para la que se hace el diseño del tratamiento, la terapia génica puede tener cualquiera de los tres objetivos siguientes:

Aumento o suplementación de genes. Intenta poner un gen activo del que actualmente carece dentro de la célula. Este podría ser el objetivo de la terapia génica en algunas enfermedades con pérdida de función, que incluyen muchas de las enfermedades vistas en nuestros *Casos* (ver a continuación). De forma adicional, podrían ser utilizados para introducir un gen nuevo en la célula, normalmente para crear vulnerabilidad en las células que uno desea eliminar. Las células cancerosas pueden sintetizar rápidamente un nuevo antígeno que podría provocar un ataque citotóxico por el sistema inmune, o una enzima intracelular que podría convertir un inocuo promedicamento en un tóxico metabolito.

En el silenciado de genes el objetivo es impedir la expresión de un gen residente. Este tipo de terapia génica podría requerirse en enfermedades causadas por ganancia de función o por mecanismos dominantes negativos. En la mayoría de los casos el silenciamiento debería ser específico para un alelo mutante, dejando inalterada la expresión del alelo normal. El silenciamiento de genes podría también ser utilizado para prevenir la expresión de genes virales en células infectadas.

Reparación de genes. El objetivo es corregir una malfunción en un gen endógeno, en vez de silenciarla o reemplazarla. Las propuestas para la reparación de genes confían en la recombinación homóloga altamente dirigida o en que la reparación de mal apareamiento corrija determinados defectos en un gen. Por otro lado, la reparación se puede hacer en el nivel de expresión, por ejemplo, manipulando el *splicing* para producir el salto o la retención de exones específicos de un gen.

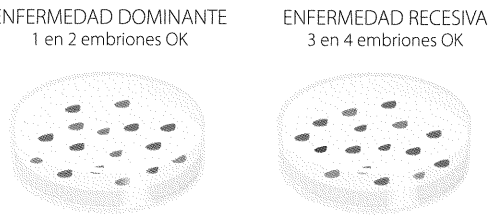


Figura 14.4 – El uso limitado de la terapia génica en la línea germinal. Las dianas para la terapia de la línea germinal podrían ser embriones creados por fertilización *in vitro*. Normalmente la FIV puede producir 5-10 embriones, de los cuales 1 o 2 son seleccionados para implantar. Un test genético podría identificar qué embriones podrían requerir terapia. Dependiendo del modo de herencia, o 1 de 2, o 3 de 4 embriones podrían ser usados sin necesidad de ninguna terapia.

Algunos de estos métodos pueden aplicarse *ex vivo*, tomando células del paciente que, después de su modificación, se devolverán *in vivo* por inyección o de otra forma, y así introducir la "construcción terapéutica" dentro del cuerpo del paciente. Igualmente, uno podría en principio tratar células somáticas o de la línea germinal. La terapia de las células germinales tiene una finalidad atractiva comparada con la terapia de células somáticas (el problema es tratar una vez a todas) pero se considera éticamente inaceptable. En realidad, los obstáculos técnicos para la terapia de la línea germinal son mucho más grandes que para la terapia somática, y es bastante difícil pensar en las circunstancias en las que la línea germinal podría ser útil si se pudiera hacer. (*Figura 14.4*).

Terapia celular

Los obstáculos para reparar tejidos y órganos dañados supliéndolos con células nuevas son la vida limitada y el potencial replicativo de la mayoría de las células, y el rechazo de células extrañas. A pesar de todo, desde luego, el trasplante de órganos se ha utilizado satisfactoriamente durante décadas, incluyendo el tratamiento de enfermedades genéticas (p. ej., el trasplante de riñón en la enfermedad de riñón poliquístico). El trasplante de células confía normalmente en un pequeño número de células transplantadas que enraízan y se multiplican. Esto requiere el empleo de **células madre.**

Es cierto que cada tejido se mantiene por un pequeño número de células madre. Estas células tienen el potencial de dividirse asimétricamente para producir otras células madre y células derivadas que pueden dirigirse a formar células funcionales del tejido (*Figura 14.5*). Las diferentes células madre difieren en el rango de tipos celulares que pueden producir. Las **células madre embrionarias** son totipotentes. Pueden producir todos los tipos celulares de un cuerpo adulto. Quizá cuando entendamos un poco más acerca de cómo crecen, se mantienen y se diferencian, seremos capaces de hacer crecer órganos y tejidos a partir de células madre embrionarias. Quizás esto será posible, o quizá no. En este momento no lo sabemos, pero el potencial es tan atractivo que laboratorios de todo el mundo están dedicando enormes esfuerzos para encontrarlo.

Las células madre embrionarias solo pueden obtenerse por destrucción de un embrión muy temprano (*Figura 14.6*). Actualmente hay mucho debate acerca del potencial de las células madre no embrionarias. La ciencia es difícil y vacilante. Aislar e identificar células madre requiere un alto grado de habilidad del laboratorio, y experimentar para explorar su potencial suele ser muy difícil de interpretar. Las primeras en la lista de las dificultades científicas son las políticas y las religiosas que promueven ciertas interpretaciones de los experimentos. Años

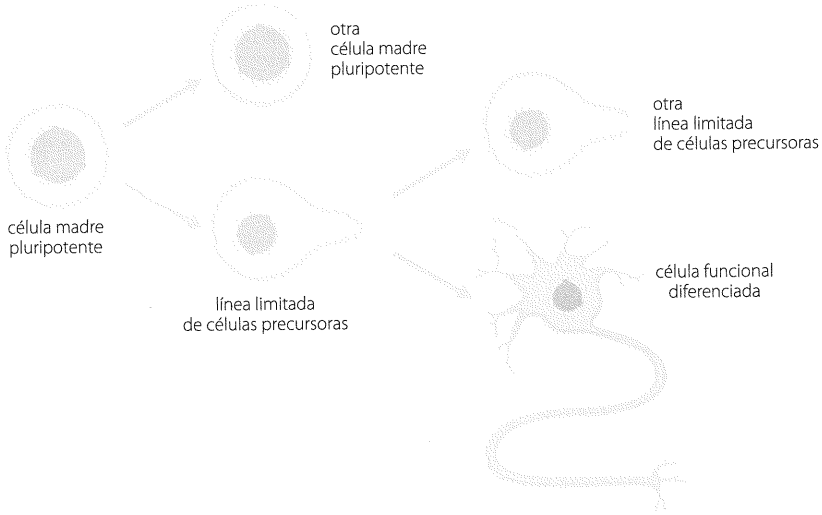


Figura 14.5 – Las células madre son capaces de renovarse a sí mismas y diferenciarse en múltiples líneas. Las células madre en el embrión pueden producir todas las células de un cuerpo adulto; otras células madre son más limitadas en el rango de tipos celulares que pueden producir.

antes de que la ciencia esté lo bastante segura, habrá que forzar un consenso sobre los principios. Desde luego, la ciencia nunca podrá dictar la ética, pero esperaremos el momento en el que todos los implicados en los argumentos éticos puedan, al menos, empezar con un acuerdo base sobre los principios.

En medio de la incertidumbre, una forma de trasplante de células madre ya parte de la práctica de la rutina clínica. La sangre de cordón contiene células madre que pueden reconstituir todo tipo de células sanguíneas y de médula ósea (y quizás otros tipos de células también). Pueden ser recogidas en todos los nacimientos sin riesgo ni enfermedad para la madre o el niño. Los métodos para la extracción de las células madre están bien establecidos. Bancos de células madre de cordones sanguíneos, congeladas en nitrógeno líquido, han sido establecidos y se usan rutinariamente en el tratamiento de leucemias y otras enfermedades sanguíneas, y para la reconstitución de la médula ósea en pacientes con cáncer que han sido tratados con una quimioterapia agresiva.

El trasplante de células heterólogas como este (p.ej., usando células derivadas de una persona diferente) aumenta el problema de rechazo y, para las células del sistema inmune, de la enfermedad injerto-versus-huésped. El trasplante autólogo, usando una de las células madre propias, podría evitar estos problemas. Hay tres formas de obtener células madre autólogas.

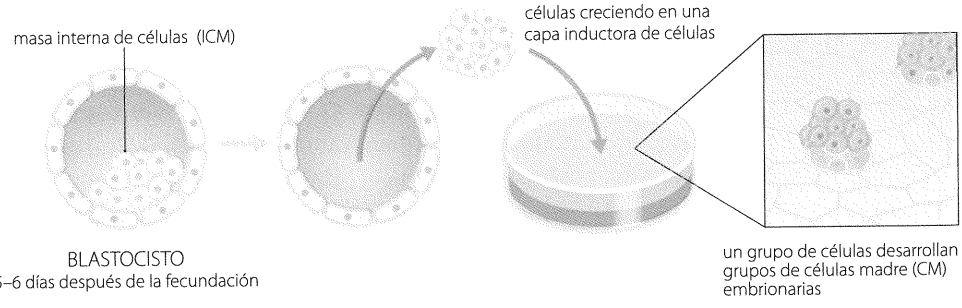


Figura 14.6 – Las células madre embrionarias (CM) derivan de 100-150 células de la masa interna de un embrión en estado de blastocisto, 5-6 días después de la fertilización. Las células ICM normalmente se colocan en una capa de fibroblastos de ratón inactivos como inductor de las células. Después se quita del blastocisto, las células ICM detienen su división y paran de expresar los marcadores de las células madre. Después de varios días, una o dos células reanudan el crecimiento y muestran una reexpresión de los marcadores de las células madre. Estas forman grupos de células de las que se obtienen las células madre embrionarias (CM). Las CM no tienen contrapartida natural en los embriones normales.

- Algunos recomiendan almacenar muestras de sangre de cordón de todos los bebés, por si fuera necesario décadas más tarde. Esto podría, sin embargo, producir sólo un rango limitado de tipos celulares.
- Mejorar métodos y entenderlos puede permitir que las células madre adultas sean aisladas de un tejido no implicado (sano) de un paciente, y hacer su transdiferenciación en células madre para el tejido apropiado. La transdiferenciación (hace que una célula madre sanguínea cambie a célula madre muscular) ha sido repetidamente publicada, pero es controvertido si ésta es la verdadera interpretación de los experimentos. Las publicaciones difieren acerca de la multipotencia y del potencial replicativo de células madre específicas de tejidos adultos. Como ocurre con las células madre embrionarias, se interpreta frecuentemente a la luz de los principios de la ética personal y de las creencias religiosas.
- Más controvertida, la **clonación terapéutica** podría ser usada para generar células madre embrionarias que contengan el genotipo del paciente (*Figura 14.7*). Mientras es cuestionable si las células madre sanguíneas o específicas de tejido puede llegar a transdiferenciarse, las células madre embrionarias podrían no sufrir esta limitación. Esta propuesta es el foco de un intenso debate ético, con algunos grupos y gobiernos intentando prohibirla, y otros clamando que podría no ser ético el hecho de no intentar desarrollar una tecnología que podría transformar la vida de numerosos pacientes. Cualquiera que sea la visión personal de este tema, es importante distinguir clonación terapéutica de **clonación reproductiva**; esto es, intentar producir un bebé clonado. Es bastante cuestionable si un blastocisto clonado es un ser humano potencial. Probablemente sería incapaz de desarrollar un niño normal si fuera implantado, debido a los defectos en la reprogramación epigenética. La gran mayoría de los blastocistos de animales clonados producidos de esta forma fallan en su desarrollo, y los pocos que llegan a término suelen ser anormales. En algunos casos estos animales parecen normales cuando son jóvenes, como la oveja Dolly, pero mueren pronto. Las células madre embrionarias, en algunas ocasiones, parecen haber borrado toda programación previa epigenética.

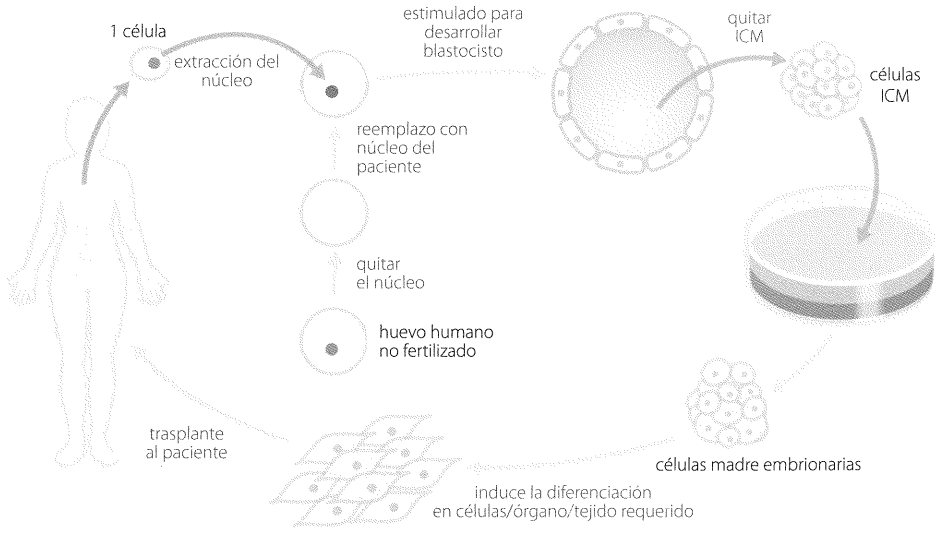


Figura 14.7 – Clonación terapéutica.
El objetivo de este procedimiento es producir células madre embrionarias genéticamente idénticas a las células del paciente. Se requieren huevos humanos no fertilizados y conlleva la destrucción de alguno de los embriones producidos. A pesar de todo, es muy distinto de la clonación reproductiva, en la que el propósito es producir un bebé clonado.

14.3. Estudio de pacientes

En vez de discutir cada caso separadamente, se han agrupado para la mayor parte de la discusión posterior.

Posibilidades para un diagnóstico prenatal

El diagnóstico prenatal podría, en principio, ofrecerse para la mayoría de las enfermedades descritas en las historias clínicas estudiadas. La excepción podría ser la leucemia (una enfermedad adquirida), la enfermedad de Alzheimer y la diabetes tipo 2 (enfermedades complejas donde la predicción genética no es posible). Para la mayoría de las enfermedades mendelianas podría ser posible sólo si la mutación causante ha sido previamente identificada; como vimos en el *Capítulo 9*, fue un reto particular en el caso de hipoacusia.

Muchas de las anomalías cromosómicas ocurren *de novo* (en los Casos 7, 8, 9, 13, 17 y 18). En estos casos el riesgo de recurrencia es muy bajo y, en general podría tranquilizarse a los padres en vez de ofrecerles un diagnóstico prenatal en futuros embarazos. En reordenamientos estructurales *de novo* (Casos 7, 13 y 17), los mosaicismos en la línea germinal nunca pueden descartarse, por tanto, implica un riesgo de recurrencia finito aunque pequeño. Si los padres estuvieran especialmente preocupados sería apropiado ofrecer el test prenatal, pero puntualizando que la oportunidad de detectar una recurrencia es menor que el riesgo de abortar por la técnica. Desde luego, los dos riesgos no son necesariamente igual de importantes, y las familias harán su propio juicio y sopesarán las medidas a tomar. En nuestros casos, de las seis familias solo Anne Howard (Caso 8, síndrome de Down) se estudió en su siguiente embarazo. En su caso, ella y su marido decidieron hacer el test, en parte por el pequeño aumento de riesgo asociado a la edad, y en parte porque creían que no serían capaces de dar a Helen toda la atención que necesitaba si tenían otro hijo con síndrome de Down.

En otras enfermedades, las decisiones acerca del diagnóstico prenatal podrían estar influidas por varios factores:

- El sistema legal y ético en el país: en muchos países el test prenatal es legal solo para una definida lista de enfermedades; en otros queda la negociación entre padres y clínicos.
- La disponibilidad práctica del test, incluyendo si alguien (el estado o una compañía de seguro) lo pagará.
- La importancia de la enfermedad: por ejemplo, mucha gente no considera la pérdida de audición como una indicación para abortar un feto afectado.
- La disponibilidad y efectividad del tratamiento: demandar un diagnóstico prenatal para la fibrosis quística, por ejemplo, depende de la visión actual y futura de las perspectivas del tratamiento.
- La edad del comienzo de la enfermedad: mucha gente no ve las enfermedades de comienzo tardío apropiadas al diagnóstico prenatal, como la enfermedad de Huntington.
- La situación individual de la familia: ¿como podrían enfrentarse emocional, física y económicamente el nacimiento de un niño afectado?

- Los principios morales o creencias religiosas de los individuos implicados: mucha gente no apoya el aborto, mientras que otros no lo ven como una mala opción.

Posibilidades actuales de tratamiento

Ninguna de las enfermedades discutidas es intratable, aunque la mayoría son incurables en el presente. En la *Tabla 14.1* se han sido dividido en aquellas en las que el problema actual es el resultado de las cosas que ocurren, o no, tempranamente en el desarrollo, y aquellas en las que el problema se debe en gran parte a cosas que están ocurriendo, o dejando de hacerlo aquí y ahora. Para el primer grupo el tratamiento es necesariamente sintomático, en tanto que para el segundo, en principio, un tratamiento más dirigido o la curación pueden ser posible.

Fenilcetonuria (Caso 22, Familia Vlasi) está cerca de ser curable en el presente. Una vez diagnosticada, el niño sigue una dieta baja en proteínas para minimizar su toma de fenilalanina. Por supuesto que alguna proteína es necesaria, como lo es alguna fenilalanina. Esta es un aminoácido esencial, es decir,

Tabla 14.1 – Resumen de los 26 *Casos* estudiados en este libro

Caso	Familia	Enfermedad en la que el problema afecta al desarrollo, por lo tanto el tratamiento es necesariamente sintomático	Caso	Familia	Enfermedad en la que el problema es una malfunción continua, donde la terapia puede tratar de rectificar la malfunción
3	Choudhary	Sordera	1	Ashton	Enfermedad de Huntington
5	Elliot	Anomalía cromosómica	2	Brown	Fibrosis quística
7	Green	Deleción 22q11	4	Davies	Distrofia muscular de Duchenne
8	Howard	Síndrome de Down	6	Fletcher	Neuropatía óptica de Leber
9	Ingram	Síndrome de Turner	11	Kavanagh	Enfermedad de células falciformes
10	Johnson	Síndrome de Marfan	12	Lawton	Hemofilia
13	Murphy	Anomalía cromosómica	14	Nicolaides	Talasemia
15	O'Reilly	Síndrome de Stickler	16	Portillo	Inmunodeficiencia severa combinada ligada al X
17	Qian	Síndrome de Angelman	20	Tierney	Leucemia aguda linfocítica
18	Rogers	Síndrome de Prader–Willi	21	Ulmer	Enfermedad de Tay–Sachs
19	Stott	Hiperplasia congénita adrenal	22	Vlasi	Fenilcetonuria
			23	Wilson	Cáncer de mama
			24	Xenakis	Poliposis adenomatosa familiar
			25	Yamamoto	Enfermedad de Alzheimer
			26	Zuabi	Diabetes tipo 2

que los humanos no pueden sintetizarlo, pero tienen que obtenerlo de una dieta proteica. Una valoración cuidadosa del nivel de fenilalanina es necesaria. Un nivel muy bajo de proteínas o fenilalanina causaría malnutrición, retraso en el crecimiento, etc., mientras que un alto nivel de fenilalanina causaría daño cerebral. Mantener al niño a dieta es muy vigilado por la familia, especialmente si hay un hermano no afectado. Amigos o vecinos bien intencionados pueden sentir pena por el niño, que parece estar sujeto a una dieta rara, y pueden darle un trato subrepticio. Las presiones de los compañeros pueden ser muy duras para que el niño las resista. Harinas especiales con la fenilalanina reducida están disponibles, por lo que el niño puede tener sus propios pasteles y galletas.

Una vez que el cerebro pare de crecer, ya no es tan susceptible a la acción tóxica de altos niveles de fenilalanina y, por lo tanto, a edades de entre 8 y 14 años al niño se le puede dar una dieta normal. La transición puede estar marcada por un trastorno emocional. Como se menciona en la *Figura 11.4*, una mujer fenilcetonúrica necesita volver a la dieta durante el embarazo, o los altos niveles de fenilalanina en su sangre dañarán el cerebro de su feto, incluso aunque genéticamente el feto no sea fenilcetonúrico.

En la *Tabla 11.3* y al final de este capítulo se dan otros ejemplos de errores innatos del metabolismo que pueden ser tratados por manipulación dietética.

La hiperplasia adrenal congénita (Caso 19, Familia Stott) es una de las pocas enfermedades genéticas que pueden ser tratadas *in utero*. Como se explicó en el *Capítulo 8*, la virilización de un bebé femenino es el resultado de un *feedback* que sobreestimula las glándulas adrenales. Si una pareja había tenido previamente un niño afectado, en siguientes embarazos la madre tomará por vía oral dexametasona, un glucocorticoide que puede atravesar la placenta, para disminuir la producción de la hormona adrenal. Esto debe comenzar en las etapas más tempranas del embarazo. Si el subsiguiente test fetal muestra que el feto es masculino, el tratamiento debe ser interrumpido. Los niños con HAC se tratan con esteroides para asegurar su crecimiento y desarrollo normales.

La leucemia aguda linfoblástica (Caso 20, Familia Tierney) en niños se trata hoy en día con bastante éxito (la enfermedad en el adulto tiene mucho peor pronóstico); del 75% al 80 % de los niños pueden esperar vivir 5 años sin ninguna recaída, y en los mejores centros las tasas de curación total (larga supervivencia sin la enfermedad) son del 80% o más. La respuesta a la terapia depende, en parte, de la genética de las células de la leucemia (una variedad de reordenamientos cromosómicos producen diferentes quimeras de oncogenes que pueden influir en el pronóstico) y, en parte, de los polimorfismos genéticos que controlan la farmacocinética (absorción, metabolismo y aclaramiento) y la farmacodinámica (respuesta de la diana) de los medicamentos usados. La respuesta al tratamiento se mide por el nivel de la enfermedad residual después de inducir la remisión. La PCR de oncogenes quiméricos específicos se emplea para verificar el número de células residuales con genotipo leucémico. En los casos favorables es el 0,01% o menos del nivel original. El trasplante con células madre también se usa con frecuencia, especialmente en los adultos. Las células derivan de sangre de cordón de niños no relacionados (ver arriba).

Jason Tierney (Caso 20) tenía dos características de pronóstico favorable, su traslocación TEL-AML1, y su deficiencia de tiopurina metiltransferasa. Aunque esto último causa problemas iniciales, también significa que estas células habrían recibido una dosis de medicamento altamente efectiva.

En las *enfermedades de comienzo tardío* de la *Tabla 14.1* hay una esperanza en la prevención. El riesgo de una diabetes tipo 2 (Caso 26, Familia Zuabi) ciertamente puede ser reducido en su mayor parte por la actividad física y el control del peso. A las personas con poliposis adenomatosa familiar (Caso 24, Familia Xenakis) se les aconseja de forma firme que extirpen su colon; desafortunadamente, todavía hay riesgo de un tumor gástrico y periampullar. Una dieta inapropiada puede reducir el riesgo de repetición. La mastectomía profiláctica es una opción para las mujeres portadoras de mutación en *BRCA2* (Caso 23, Familia Wilson); aquellas con mutaciones en *BRCA1* también suelen optar por una ooforectomía. Un seguimiento regular es importante para las personas con alto riesgo de cáncer. Se sabe que la falta de intervencionismo reduce el riesgo de la enfermedad de Huntington (Caso 1, Familia Ashton) o de la enfermedad de Alzheimer (Caso 25, Familia Yamamoto).

El tratamiento de la mayoría de enfermedades de la *Tabla 14.1* es sintomático.

Posibilidades de la terapia génica

En principio, la terapia génica podría ser aplicable a algunas de las enfermedades de la columna de la derecha de la *Tabla 14.1*, en las que el problema es una malfunción genética continua.

- En las enfermedades complejas (Alzheimer, diabetes) cualquier terapia no debería intentar corregir la susceptibilidad inicial genética porque, como hemos visto, el efecto de cualquiera de los genes es pequeño. Posiblemente algún punto en el final de la ruta de patogénesis podría presentar una diana accesible, pero en general la terapia génica no es la primera línea de ataque a las enfermedades complejas.
- En las leucemias y el cáncer, cualquier terapia podría estar dirigida a las células neoplásicas. Las herramientas clínicas han tratado de hacer que las células neoplásicas sean más inmunogénicas expresando antígenos extraños en la superficie celular.
- Como una enfermedad de aumento de función, la enfermedad de Huntington podría necesitar una versión más sofisticada de terapia génica que la de las enfermedades de nuestra lista, en la que todas son causadas por pérdida de función y pueden, en principio, ser tratadas por aumento de genes.
- Como se menciona arriba, las dianas más fáciles para el aumento de genes son las enfermedades en las que el nivel exacto de expresión de los genes introducidos no es importante y un nivel bajo podría ser clínicamente útil. Esto hace que la fibrosis quística, la distrofia muscular de Duchenne, la hemofilia y la X-SCID sean las dianas más apropiadas.
- En la distrofia muscular de Duchenne, el gran tamaño de los genes y la dificultad de introducir un gen extraño en alta proporción en las células musculares ha tenido ensayos de terapia génica muy frustrantes.

La X-SCID es de lejos la primera historia con éxito de la terapia génica (Caso 16, Familia Portillo). En la *Sección 9.3* mencionamos que un familiar distante recientemente había tenido el segundo niño afectado en la familia Portillo. Para este bebé las perspectivas son mucho más brillantes que para Pablo, que había nacido en 1989. Hay dos opciones:

- Trasplante de médula ósea. Si se hace pronto da buenos resultados. Si no es posible un hermano emparejado en el HLA, se puede usar la médula de un padre o un hermano que comparta un haplotipo HLA con el niño afectado, aunque la tasa de éxito no es muy alta. Primero se depleciona la médula de células T para evitar la enfermedad injerto-huésped.
- Terapia génica. El trabajo pionero del grupo de Alain Fischer en París (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2002) curó con éxito a 9 de 11 niños con X-SCID (*Figura 14.8*). A pesar de todo, el gran optimismo pasó a pesimismo cuando dos de los bebés tratados, y más tarde un tercero, desarrollaron leucemia de células T. En dos de los casos se demostró que fue debido a la integración del vector retroviral cerca de un oncogén, *LMO2*. El fuerte promotor empleado causó una alta expresión del gen terapéutico *IL2RG* que tenía un efecto de regulación al alza en la expresión de *LMO2*. Es similar a la vía de la traslocación 8;14 en el linfoma de Burkitt una regulación al alza del oncogén *MYC* al colocarse a continuación del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas que está altamente expresado (*Capítulo 12*).

Después del shock inicial, cuando los intentos de la terapia génica retroviral fueron interrumpidos en todo el mundo, se recuperó algo de optimismo. La leucemia se puso bajo control. Sin terapia génica estos niños podrían haber muerto. Cuando no hay alternativa hay que arriesgarse. Alguna modificación del diseño del vector o del protocolo de tratamiento podrían disminuir el riesgo. El riesgo de esta clase de activación insercional ha aumentado la lista de problemas potenciales en la terapia génica usando vectores integrantes.

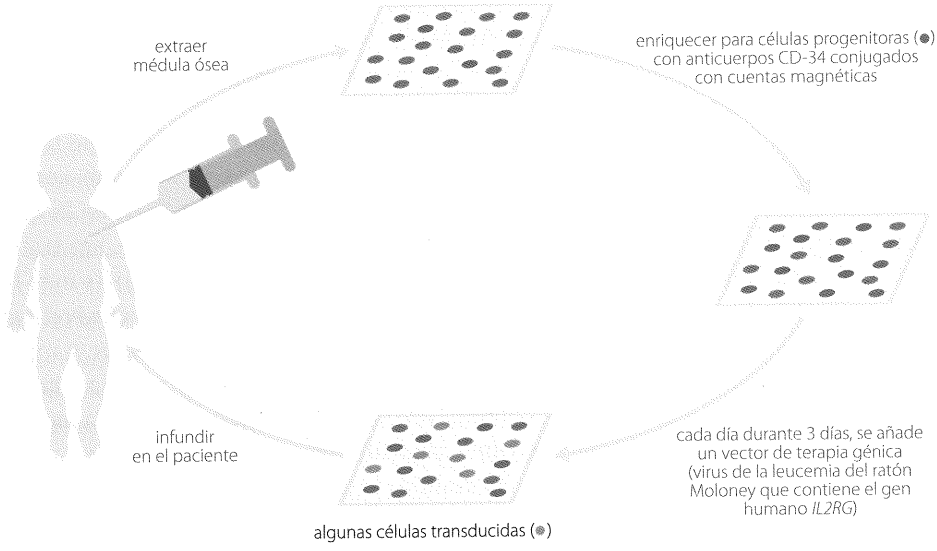


Figura 14.8 – Protocolo de terapia génica para inmunodeficiencia severa combinada. La enfermedad está causada por la pérdida de función por mutación en el gen receptor de citokina *IL2RG*. Un vector retroviral se usó para integrar una copia funcional del gen en los cromosomas de las células precursoras hematopoyéticas. Esto les dio una ventaja selectiva cuando fueron reinfundidas al paciente, y fueron capaces de reconstituir la función de las células T y células NK en 9 de los 11 bebés tratados. Un tratamiento similar no tuvo éxito en pacientes mayores con una malfunción parcial del gen.

Posibilidades de la terapia celular

La enfermedad de Huntington y la de Alzheimer están a la cabeza de la lista de candidatos para la terapia basada en células. Observando la causa inicial, en ambos casos es la pérdida de células de una región específica del cerebro. El cerebro es un sitio inmunológicamente privilegiado; esto es, los aloinjertos (injertos de diferentes individuos de la misma especie) no se rechazan, aunque los xenoinjertos (de diferentes especies) lo hacen con frecuencia. Los animales estudiados han demostrado largas supervivencias de células cerebrales trasplantadas.

Los intentos preliminares se habían hecho con trasplante de células estriadas en la enfermedad de Huntington. Recientemente se ha publicado un seguimiento de 6 años (Bachoud-Levy *et al.*, 2006). Cinco pacientes con la enfermedad de Huntington recibieron injertos de tejido cerebral fetal en el estriado. El tejido fue obtenido de la correspondiente región del cerebro de fetos procedentes de abortos humanos de 7,5 a 9 semanas; un estado del desarrollo en el que el cerebro contiene suficientes células precursoras neuronales. El resultado demostró mejoría en algunos casos, y una parada temporal en la progresión normal de la enfermedad. A los 6 años el deterioro normal fue de nuevo evidente. El trasplante de células puede (a veces) reemplazar la pérdida de la población celular, pero no detiene la neurodegeneración en el resto de las regiones afectadas del cerebro.

Estos ensayos dan una esperanza real de que puede desarrollarse la terapia celular para la enfermedad de Huntington. La mayor limitación presente es la fuente de células. Dejando aparte los problemas éticos por el uso de tejido de fetos abortados, el tejido debe ser usado fresco y no debe ser caracterizado o haber crecido en el laboratorio. El progreso real depende de la identificación de las células madre que pueden almacenarse, crecer en el laboratorio cuando se requieran e inducirlas a diferenciarse del modo apropiado.

14.4. Resumen y ampliación

A largo plazo, la mayoría de las personas esperan un tratamiento efectivo para muchas de las enfermedades genéticas restantes por terapia génica o trasplante de células madre, aunque de hecho los tratamientos basados en el conocimiento de los mecanismos genéticos y moleculares pueden ser igualmente efectivos sin demasiados riesgos asociados.

Terapia génica

Las esperanzas en la terapia génica han seguido un curso maníaco-depresivo en los últimos 20 años, con altibajos recurrentes. Al inicio, mucha gente pensaba que parecía fácil transferir la técnica del laboratorio a la clínica. En 1990 se proclamó que un niño con inmunodeficiencia combinada (un tipo de deficiencia en adenosina deaminasa autosómica recesiva, no el tipo descrito en el Caso 16 ligada al X) había sido curado por terapia génica. De hecho la terapia de reemplazamiento del enzima, empleada simultáneamente con el intento de terapia génica, fue la responsable del equívoco.

El problema constante de la terapia génica es conseguir razonablemente una larga duración y un alto nivel de expresión del gen introducido.

- Primero, una proporción suficiente de células en el tejido diana deben ser transfectadas. Los vectores retrovirales dan una alta eficiencia, pero solo pueden ser usados en células en división, como vimos con la X-SCID, la integración es un beneficio mixto. Los adenovirus parecen ser vectores no-integrantes prometedores, pero a altas dosis pueden causar respuestas inflamatorias que, en el caso de Jesse Gelsinger fue fatal (ver http://www.uvm.edu/~cgep/Educational/Expert.htm). Ninguno de los métodos físicos detallados en la *Sección 14.2* pueden afectar a una proporción útil de células bajo las condiciones clínicas reales. Nuevos vectores virales pueden ser más prometedores.
- Después, un suficiente alto nivel de expresión se puede conseguir. Ya que esta es la dificultad, la mayoría de los trabajos se han centrado en enfermedades en las que bajos niveles de expresión deberían ser beneficiosos. La fibrosis quística y la hemofilia son ejemplos de enfermedades donde el 10% de la expresión normal podría tener beneficios clínicos reales.
- Si se llegara a la expresión adecuada, el siguiente problema sería cómo controlarlo. Las hemoglobinopatías debería ser buenas dianas para la terapia: los genes son pequeños y excepcionalmente bien conocidos, y las enfermedades son enormemente importantes. El problema es que el nivel de expresión de un gen de globina introducido podría necesitar un control exacto. La sobreexpresión de un gen introducido de β-globina podría convertir a pacientes con β-talasemia en pacientes con α-talasemia.
- La expresión estable ha resultado ser muy difícil de conseguir. Comúnmente las células emplean mecanismos epigenéticos para desconectar la expresión de transgenes. Los vectores no-integrantes son especialmente proclives a dejar de funcionar después de un corto espacio de tiempo. Esto ha conducido a muchos investigadores a centrarse en situaciones donde la expresión a largo plazo no es necesaria; matar células cancerígenas o células viralmente infectadas, por ejemplo.

Debido a todos estos problemas, hay una enorme masa crítica de investigación y desarrollo en terapia génica. Muchos sistemas ingeniosos han sido demostrados en experimentos de laboratorio. Decenas de compañías persiguen nuevos enfoques. Cientos de ensayos clínicos de fase I han sido realizados, particularmente para cáncer y enfermedades infecciosas más que para enfermedades mendelianas. A pesar de los problemas, la X-SCID permanece como un hito exitoso. Dado el creciente de número de métodos para manipular los genes y su expresión, es difícil creer que nada útil se consiga en la siguiente década. Quizá la principal cuestión es si algún descubrimiento será un avance aplicable de forma generalizada, llevando la terapia génica a una lista completa de enfermedades, o si habrá una serie de trucos para enfermedades y células determinadas que resultarán muy beneficiosos para unos pocos pacientes pero dejaran a la mayoría para más adelante.

Terapia con células madre

Esta ha sufrido el mismo gran despliegue publicitario como el que dañó la reputación de la terapia génica en los noventa. Es fácil pintar un cuadro fascinante de tejidos y órganos creciendo bajo demanda en un mundo nuevo, pero si esto

tenía alguna relación con la realidad es otra cuestión. Todavía conocemos muy poco acerca del verdadero potencial de las células madre embrionarias u otros tipos de células madre. El número de células madre embrionarias actualmente disponibles es muy pequeño, lo que para una extensa investigación de gran utilidad, ilustra el grado de dificultad que todavía tienen estas técnicas. Comparado con las dificultades técnicas, los obstáculos legales no serán probablemente factores que impidan el progreso. La investigación será realizada en países donde no solo esté permitido, sino fuertemente promocionado. Si alguna de las beneficiosas promesas clínicas se consigue, la presión de los grupos de pacientes permitirá que la tecnología sea políticamente irresistible.

Mientras esperamos estas nuevas tecnologías para vivir más de los esperado, es muy fácil pasar por alto todo lo que realmente se está consiguiendo.

Diagnóstico y consejo

Puede no ser dramático, pero puede marcar una gran diferencia en la vida de las familias afectadas por enfermedades genéticas.

- Un diagnóstico es la piedra angular para el manejo clínico. Sin él, el manejo clínico no está enfocado y no se anticipa a las complicaciones.
- Cuando el diagnóstico es de una enfermedad letal, p. ej., la trisomía 18, la conducta clínica más apropiada consiste en cuidados paliativos incluso si está presente una malformación estructural subsanable quirúrgicamente.
- Las familias suelen consultar a muchos médicos, por lo que a sus hijos se les harán múltiples análisis en busca de un diagnóstico. Llevarlo al especialista adecuado es importante.
- Establecer un diagnóstico y dar información acerca de la enfermedad tiene un valor real terapéutico para muchas personas. Se pueden hacer relaciones con grupos de apoyo. Las familias tienen algo que decir para conseguir fácilmente servicios educativos y sociales.
- Un diagnóstico y consejo pueden ayudar a disipar la culpabilidad y el enojo que pueden impactar seriamente en la calidad de vida de las familias después del nacimiento de un niño con malformaciones o enfermedades. No es fácil explicar a los padres que no ha sido provocado por algo que alguno de ellos haya hecho. Las habilidades profesionales de un consejero pueden ayudar a los padres a sobreponerse a las reacciones naturales de shock, dolor y enfado.
- Aconsejar puede aliviar la ansiedad disipando estimaciones generales exageradas de riesgos de recurrencias y, especialmente en enfermedades ligadas al X y recesivas, identificando a los miembros de la familia que tienen riesgos insignificantes. Contrariamente a la creencia popular, en genética clínica son más las personas que tienen buenas noticias y bajos riesgos, que malas noticias y altos riesgos.
- Aunque aconsejando no se pueda suprimir el problema real de vivir con un miembro afectado de la familia, se puede ayudar a las personas a centrarse en soluciones, mejor que en problemas. Debe poderse dar ayuda apropiada. A los padres se les puede dar un rango de opciones para manejar el riesgo de recurrencia.

Análisis

Los análisis son una parte crucial del objetivo de permitir a familias afectadas por una enfermedad genética poder vivir una vida lo más normal posible. Esto está bien ilustrado en un estudio de Modell *et al.* (1980) en familias con riesgo de formas graves de talasemia. Antes de que estuviera disponible el diagnóstico prenatal, cuando el nacimiento de un niño afectado hacía que una pareja fuera consciente de su riesgo de 1 de cada 4 de tener más niños afectados, dejaban de tener hijos. Los siguientes embarazos eran accidentales y buscaban su interrupción en el 70% de los casos. El diagnóstico prenatal para estas enfermedades empezó a estar disponible en 1975. Las parejas en riesgo reanudaron las reproducciones normales, con menos del 30% de embarazos interrumpidos por talasemia. El efecto del diagnóstico prenatal fue reducir el número de abortos y permitir a las parejas de alto riesgo tener familias normales.

El ejemplo real, descrito a continuación, de una familia con distrofia muscular de Duchenne, ilustra cómo el aumento de precisión tanto en el test de portadores como en el prenatal puede permitir a las parejas evitar la interrupción de embarazos buscados. La *Figura 14.9* muestra cómo la distribución del riesgo de portadores para la distrofia muscular de Duchenne entre familias conocidas de un centro genético ha cambiado por los nuevos conocimientos que permiten tests genéticos más precisos.

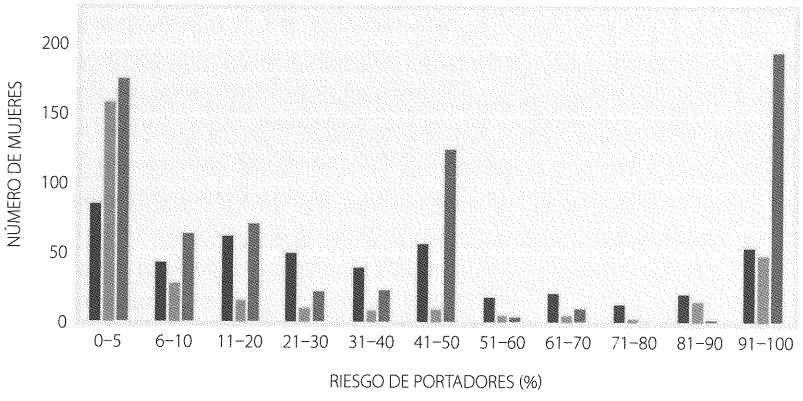


Figura 14.9 – Distribución del riesgo de portadores de DMD entre mujeres en familias del North West Genetic Register, Manchester.
Barras azules: riesgos basados en el árbol genealógico y creatina-kinasa, antes de que los tests moleculares estuvieran disponibles. Barras verdes: distribución del riesgo en 1989 entre mujeres en las que la estructura del árbol genealógico permitía un rastreo genético. Barras rojas: riesgos cuando el test directo de mutación empezó a estar disponible. Los picos de riesgos intermedios en las últimas series son principalmente de chicas demasiado jóvenes para analizarse. Datos cortesía de la Dra. Elizabeth Howard, St. Mary's Hospital, Manchester.

Tratamiento

El tratamiento está disponible para un amplio rango de enfermedades genéticas. Concentrándose en las esperanzas de tecnologías punta como la terapia génica o la terapia con células madre, se distrae la atención del incremento muy real de los avances que se han hecho en tratar un amplio rango de enfermedades genéticas. Estamos en deuda con un excelente y breve artículo de Munnich (2006) con una lista de algunos de estos avances.

El punto central hecho por Munnich es que los pacientes no sufren por sus mutaciones, sino por las consecuencias funcionales de estas. Muchas veces el conocimiento de la mutación o de los genes es irrelevante para el tratamiento. No necesitamos saber si en un paciente genético con fallo en el riñón, este fallo se debe al síndrome de Alport, a la enfermedad del riñón poliquístico o

a la nefronoptisis para saber que un trasplante de riñón mejoraría gratamente su vida. No necesitamos conocer cuál de los 100 genes posibles ha causado la sordera a un niño antes de que podamos considerar los posibles beneficios de un trasplante coclear. Hasta en la enfermedad de Huntington, una famosa enfermedad "intratable", la vida para el paciente y sus cuidados pueden mejorarse con medicamentos como los neurolépticos y antidepresivos, y vigilando la dieta y el ambiente del hogar.

En otros casos, un conocimiento cercano a la función del gen, aunque no necesariamente del gen mismo, es la llave del tratamiento. La *Tabla 14.2* da algunos ejemplos y casos especialmente interesantes, incluyendo los siguientes:

- La tirosinemia tipo I (OMIM 276700) es un error innato del metabolismo grave que es especialmente prevalente en la región de Québec Saguenay-Lac Saint Jean debido a un efecto fundador. Refiriéndonos al diagrama del catabolismo de la tirosina (*Figura 8.4*), la enzima defectiva está más abajo del paso final mostrado. El bloqueo produce una acumulación de ácido maleilacetoacetico, y la reacción siguiente produce succinilacetona. Este metabolito anormal inhibe la producción de porfobilinógeno en el camino de la biosíntesis del heme (ver figura en *Cuadro de enfermedad 8*). El resultado es un síndrome grave similar a la porfiria que lleva a la muerte a través de fallo del hígado o cáncer. La tirosinemia tipo II, por el contrario, es una enfermedad leve en la que el primer paso del catabolismo de la tirosina es bloqueado (*Figura 8.4*). NTBC (2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)-1,3-ciclohexanediona) inhibe la enzima tirosina transaminasa, que es deficiente en esta forma leve de tirosinemia. Esta produce una fenocopia de la enfermedad de tipo II. Por este bloqueo, no hay producción de ácido maleilacetoacetico, y los pacientes con esta enfermedad pasan de la fatal tipo I a la enfermedad leve tipo II.
- En la enfermedad de glucoproteína carbohidrato-deficiente tipo Ib (OMIM 602579), el defecto subyacente es la imposibilidad de isomerizar la fructosa a manosa (deficiencia de manosa fosfato isomerasa); los síntomas, diarrea profusa y enfermedad severa del hígado, son enteramente debidos a la falta de manosa. Se puede rectificar completamente suministrando manosa por vía oral.
- La cistinosis (OMIM 219800) es una atípica enfermedad lisosomal de depósito. El defecto no está en una enzima lisosomal, sino en una proteína transportadora de membrana lisosomal. La acumulación produce síntomas que incluyen fallo renal, insuficiencia pancreática, erosión corneal, complicaciones del sistema nervioso central y miopatía severa. La cisteamina oral es un tratamiento efectivo. La cistina está formada por dos moléculas de cisteína unidas por uniones S-S (*Figura 14.10*). La cisteamina, suministrada oralmente, entra a los lisosomas usando un transportador específico. Allí puede desplazar una molécula de cisteína de una cistina para formar una mezcla cisteamina-cisteína bisulfato que es capaz de salir del lisosoma, aparentemente mediante un transportador de lisina. Una vez fuera del lisosoma, la mezcla disulfato puede ser reducida, liberando la cisteamina para unirse a otra molécula de cisteina fuera del lisosoma.

En otros casos las intervenciones son con dianas más específicas que cambian la expresión de los genes. Semejantes tratamientos son aún experimentales en su mayoría, por ejemplo:

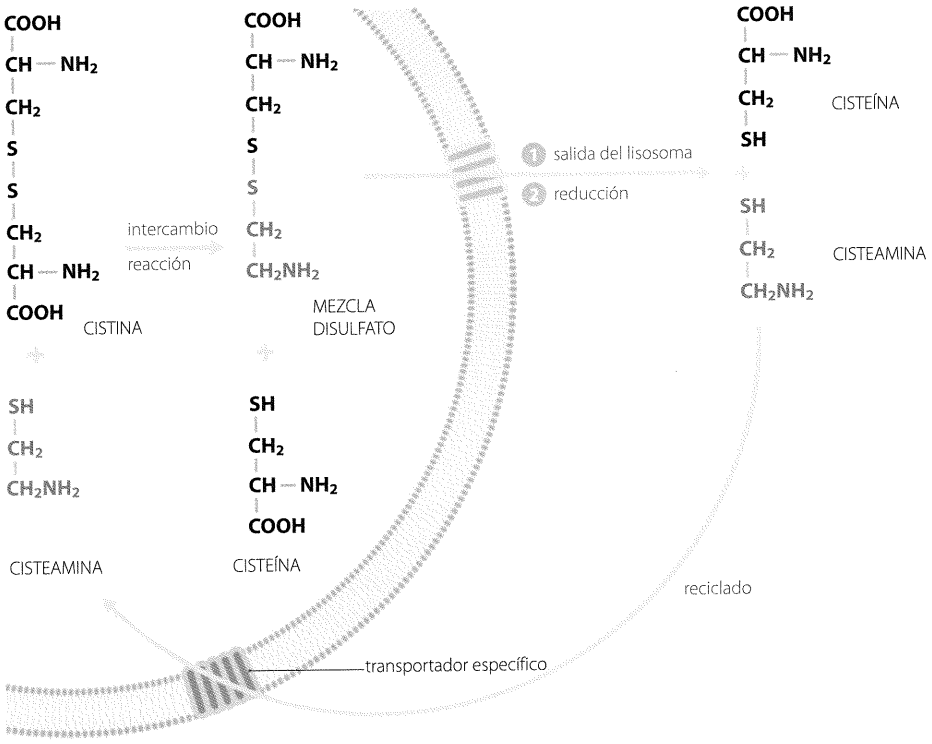


Figura 14.10 – Tratamiento de la cistinosis con cisteamina.
La cisteamina y la mezcla bisulfato son capaces de cruzar la membrana lisosomal, pero el paciente con cistinosis pierde la proteína transportadora específica que en personas normales permite a la cisteína salir de lisosoma. Sus síntomas son causados por la acumulación de cisteína en el lisosoma.

- Los síntomas de deficiencias o anomalías de β-globina en la enfermedad de células falciformes o β-talasemias son leves en los pacientes que continúan expresando la hemoglobina fetal durante la vida adulta (persistencia hereditaria de hemoglobina fetal, HPFH). En los pacientes en los que la producción de γ-globina fetal finaliza como parte del desarrollo normal, se puede estimular la reexpresión de genes por tratamiento con hidroxiurea.
- El antibiótico gentamicina puede inducir pérdida del sentido de la lectura de ARNm por los ribosomas, tal que los ribosomas ocasionalmente ignoran un codón de parada. La gentamicina se ha empleado para mejorar los síntomas en pacientes con fibrosis quística que tiene una mutación sin sentido. Sería catastrófico hacer que los ribosomas ignoraran un alto porcentaje de los codones de parada, pero incluso un grado muy pequeño de progreso de lectura puede permitir significantes mejoras clínicas en fibrosis quística.
- El medicamento anticonvulsionante valproato afecta al *splicing* intrón-exón. Ensayos preliminares en atrofia muscular espinal (OMIM 253300, vista en la *Sección 6.2*) sugieren que el valproato puede prolongar la vida de los niños afectos. Otros caminos dirigidos a modificar el *splicing* han sido ensayados en el gen de la distrofina. El objetivo es inducir el salto de exones específicos de forma que las deleciones que afectan el marco de lectura se hagan neutrales y convertir la distrofia muscular de Duchenne en la forma leve de Becker (ver *Sección 6.2*)

Tabla 14.2 – Ejemplos de enfermedades genéticas donde los síntomas pueden disminuirse o en algunos casos eliminarse por tratamientos basados en el conocimiento de la malfunción, pero no necesariamente de la secuencia de ADN.

Estrategia	Ejemplo	Enfermedad
Suplementar la molécula perdida		
	Insulina	Diabetes
	Hormona del crecimiento	Enanismo hipofisario
	Factor VIII	Hemofilia A
Reemplazo de la enzima deficitaria		
	Beta-glucosidasa ácida	Enfermedad de Gaucher
	Alfa-galactosidasa	Enfermedad de Fabry
	Alfa-glucosidasa	Enfermedad de Pompe
Suplementación dietética		
	Dieta rica en carbohidratos	Enfer. de depósito del glicógeno
	Colesterol	Síndrome de Smith–Lemli–Opitz
	Manosa	Síndrome 1b de glicoproteína carbohidrato deficiente
	Biotina	Deficiencia de carboxilasa que responde a biotina
	Piroxidina	Homocistinuria que responde a piridoxina
	Cobalamina	Aciduria orgánica que responde a cobalamina
	Alfa-tocoferol	Ataxia pseudo-Friedreich
	Creatina	Deficiencia de sínteis de creatina
Restricción dietética		
	Dieta baja en fenilalanina	Fenilcetonuria
	Dieta baja en proteínas	Enfermedad del jarabe de arce
	Dieta baja en grasas	Hipercolesterolemia
	Evitar ácido pitánico	Enfermedad de Refsum
Actividad enzimática residual aumentada		
	Fibratos	Alt. en la oxidación de ácidos grasos
Eliminar un producto tóxico		
	Sangrías regulares	Hemocromatosis
	Cisteamina	Cistinosis
Bloqueo de un proceso patógeno		
	NTBC	Tirosinemia Tipo I
	Bisfosfonatos	Osteogénesis imperfecta

Datos de Munnich (2006).

Los oligonucleótidos son diseñados a la carta para emparejar la unión relevante exón-intrón. Este abordaje falla mucho en el campo de la terapia génica, con los problemas habituales de asegurar la efectividad en el reparto y expresión de los oligonucleótidos.

La verdadera historia de una familia de Manchester (nótese que solo el nombre ha sido cambiado) afectada de distrofia muscular de Duchenne muestra cómo los avances en genética, a lo largo de las pasadas tres décadas, han mejorado sus vidas, aunque una curación o un tratamiento efectivo para la enfermedad es aún difícil de encontrar.

- En 1977, el niño Alan, de 3 años, fue diagnosticado como DMD, en el examen clínico básico (problemas de correr y subir escaleras, pseudohipertrofia de las pantorrilas), creatina kinasa elevada en suero e histología del músculo.
- Su madre, Betty, fue referida a un servicio de genética. Cuando se hizo el árbol genealógico (*Figura 14.11*, parte gris), mostraba que Betty había tenido dos hermanos afectados, ambos ahora en silla de ruedas desde los 20 años. Por ello, Betty y su madre, Cristina, son portadoras obligadas. Betty tiene dos hermanas, Delia y Elly. A través de Betty, Delia y Elly fueron invitadas a ir a la clínica genética y fueron informadas acerca de su 50% de riesgo de ser portadoras. Fue tomada una muestra de sangre para el test de la creatinina kinasa, pero los resultados de Delia y Elly no fueron ni lo bastante altos o bajos para modificar significativamente sus riesgos de ser portadoras.
- En 1982 Delia, ahora casada, estaba embarazada. Ella solicitó el sexo fetal. La amniocentesis fue realizada en la semana 16. Se necesitan 2 semanas para tener suficientes células en división para el análisis citogenético. Esto mostró que el feto era masculino. El buscado embarazo fue terminado por parto inducido en la semana 18.
- En 1984 Delia quedó embarazada de nuevo, pero abortó en la semana 10 antes del test. Elly estaba ahora casada pero, habiendo visto los traumas de sus hermanas, no estaba dispuesta a arriesgarse a tener hijos.
- En esa época marcadores del ADN que estaban relacionados con el locus DMD habían sido definidos. La huella genética (ver *Capítulo 9*) fue usada para determinar si Delia y Elly eran portadoras. Como todos los marcadores mostraban al menos un 5% de recombinación con la enfermedad, fueron usados dos marcadores, uno proximal y otro distal del mapeo del locus de la enfermedad. Si una meiosis fue no recombinante para los dos marcadores, habría solo un pequeño riesgo de que pudieran ser recombinantes entre los dos marcadores y la enfermedad; solo dobles recombinantes podrían producir ese resultado. Si una meiosis mostraba recombinación entre los dos marcadores, la predicción no podía ser hecha, pero al menos una falsa predicción podría haber sido evitada. El resultado de este análisis (líneas magenta en la *Figura 14.11*) sugería que Delia tenía un 99% de riesgo de ser portadora, mientras que el riesgo de Elly era menor, de un 2%. Retrospectivamente, el riesgo de que el feto abortado por Delia en el primer embarazo pudiera haber estado afectado se incrementó de un 25% al 50%, lo cual hizo que Delia tuviera más confianza en que había hecho lo correcto. Elly no se sintió capaz de formar una familia.

- En 1985 Delia quedó embarazada por tercera vez. Ahora la biopsia de vellosidad corial estaba disponible (líneas verdes en la *Figura 14.11*). Esta se realizó en la semana 10. Un rápido análisis citogenético mostró que el feto era masculino. El embarazo fue terminado quirúrgicamente en la semana 11.
- En 1988, una biopsia de vellosidad corial en el cuarto embarazo de Delia mostró que el feto era femenino. Dio a luz una niña sana.
- En 1993 Delia quedó embarazada por quinta vez. Pero ahora el gen de la distrofina estaba clonado (líneas azules en *Figura 14.11*). El test en el ADN de Alan identificó la mutación familiar, una deleción frame-shifting del exón 45 (ver *Tabla 6.2*). La biopsia de vellosidad corial fue realizada. El análisis citogenético mostró un feto masculino. Los tests moleculares para secuencias específicas del Y confirmaron que el feto era masculino, pero el exón 45 del gen de la distrofina del ADN fetal pudo ser amplificado, mostrando que no había heredado la mutación. El embarazo continuó y Delia dio a luz un niño normal.

Esta historia familiar ilustra muchos aspectos de los servicios de genética. Primero, cómo los avances científicos pueden acabar en una asistencia clínica; segundo, que las opciones individuales de los miembros de la familia pueden cambiar a pesar de que la enfermedad permanezca incurable, y tercero, el seguimiento a largo plazo de las familias. La hermana de Delia deseó rápidamente conocer su estatus de portadora y sus opciones.

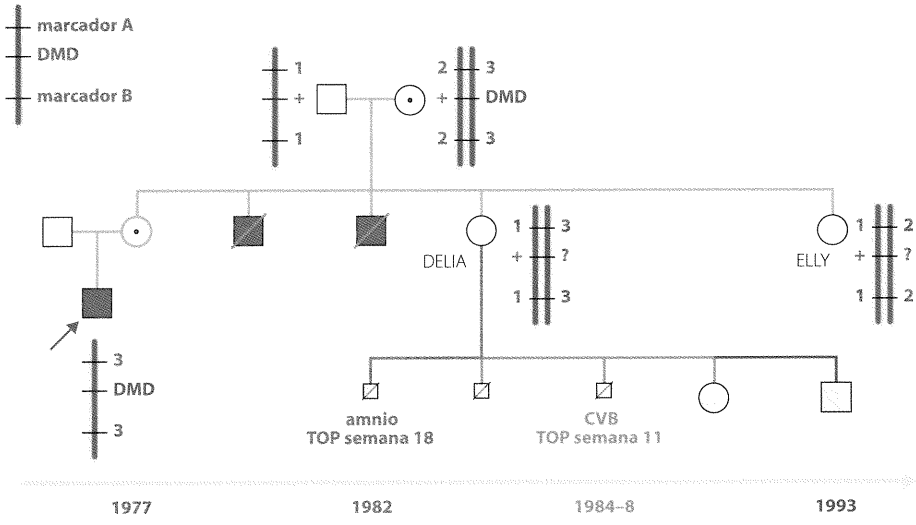


Figura 14.11 – Cómo los avances en genética afectan a familias con distrofia muscular de Duchenne.
Esta es una familia auténtica; solo los nombres han sido cambiados. Los colores muestran cómo el árbol genealógico evoluciona en el tiempo. Las líneas negras representan el resultado de la huella genética utilizando dos polimorfismos de ADN, A y B situados a cada lado del locus de la enfermedad. Los números de los alelos son arbitrarios; + significa alelo normal en el locus *DMD*. TOP, terminación del embarazo.

Finalmente, podemos considerar algunas de las objeciones que han surgido en contra del progreso continuo de la genética clínica.

- *Ayudar a las personas con enfermedades genéticas a llevar una vida normal les permite transmitir sus genes mostrando una irresponsable carencia de preocupación sobre futuras generaciones.* Ya se trató este tema en relación con las enfermedades mendelianas en el *Capítulo 10*. En relación a las enfermedades complejas, realmente es una objeción hacia toda la medicina e incluso hacia toda la civilización. ¿Qué es una sociedad civilizada sino un intento colectivo para evitar la selección natural?

- *Ofrecer el diagnóstico prenatal para una enfermedad genética desprecia a las personas con esta enfermedad.* Comprensiblemente, la personas con espina bífida, acondroplasia o síndrome de Down son altamente sensibles a la sugerencia de que ellos no deberían haber nacido. El deseo de los padres por tener niños sanos entra en conflicto con la necesidad de respetar la vida de las personas con discapacidades. Cada uno de nosotros probablemente tiene su propio punto de vista en el cual nosotros dibujamos la línea. Una solución general única al conflicto (no permitiendo elegir o elegir sin trabas) es inaceptable para la mayoría de las personas en la mayoría de los países. Quizás lo más deseable es intentar en todo lo posible burlar el conflicto insistiendo que, cualquier indicación puede aceptarse para la interrupción del embarazo, pero cuando nace un niño afecto nosotros deberíamos valorarlo tanto como cualquier otra persona y proporcionar el soporte adecuado a la familia.
- *Curar ciertas enfermedades es otro camino de menospreciar a las personas que tienen esa enfermedad.* Esto viene a cuento en relación con los implantes cocleares para la sordera en niños. Si esto se hace a un niño muy joven puede tener éxito en términos de permitir al niño entender el lenguaje. Muchas personas oyentes no cuestionan el beneficio de permitir oír a un niño sordo, pero mucha gente en la comunidad de sordos lo ven de otro modo. Ellos sostienen que ensayos para curar la sordera es equivalente a intentar socavar su cultura.

  Esto es similar a la cuestión de si personas pertenecientes a grupos lingüísticos minoritarios deberían ser educadas en su propia lengua minoritaria o en la lengua nacional de su país. Para un individuo, aprender un idioma nacional amplia sus oportunidades, pero amenaza con la extinción de la cultura minoritaria en una o dos generaciones. Quizás el principal objetivo del implante coclear es hacer al niño bilingüe, en el leguaje de signos y en el hablado. Esta es la política en Suecia y en otros pocos lugares. Es digno puntualizar que la mayoría de los niños con pérdida del oído profunda han nacido en familias oyentes y no son parte de la comunidad de sordos en sus años de formación. La solución sueca les deja libertad para tomar sus propias decisiones acerca de a quien pertenecerán cuando sean mayores para hacerlo.
- *Los avances en los test genéticos y en las opciones de reproducción nos lleva a un terreno resbaladizo.* El termino "diseñador de bebes", tan querido por los periodistas, surge pronto en cualquier discusión y se usa repetidamente en conexión con el "salvador de hermanos". Hay niños nacidos por fecundación *in vitro*, en la que los embriones son seleccionados para ser HLA-compatibles con un niño mayor que tiene una enfermedad grave que podría ser curada mediante un trasplante de células madre de cordón HLA-compatible. Esta selección permite, dicen los críticos, abrir la puerta a una selección de embriones realizada por razones no médicas.

  Lo absurdo de esta objeción puede verse mirando la *Figura 14.4*. Supongamos que el señor y la señora Frank N. Stein quieren un niño alto, de ojos azules, rubio y un CI de 150. Realizarán una traumática y cara FIV y finalmente tendrán 8 embriones en una placa. Cuatro son

femeninos y son descartados. Los ojos azules y el pelo rubio no son caracteres mendelianos simples, pero son normalmente recesivos. Las fotografías de los padres no muestran personas rubias de ojos azules, por ello deben asumir que son heterocigotos para estos rasgos. Por tanto sólo 1 de 4 de los embriones cumplirán sus aspiraciones pigmentarias. Por lo tanto, descartan tres y se quedan sólo con uno. ¡Qué pena si nace un varón de 160 cm de altura y un coeficiente intelectual de 95!

El ejemplo del "diseñador de niños" muestra que hay muy poco recorrido en la selección de embriones. A pesar de todo, si la técnica de la terapia génica de la *Figura 14-8* fuera aplicada a los embriones de la *Figura 14-4* la historia podría ser muy diferente. Supóngase que en el futuro todas las limitaciones de la manipulación génica hayan sido superadas, por tanto cualquier alteración genética podría ser atajada de forma segura y con alta eficiencia. Quizás realmente los niños puedan ser diseñados a la carta. Quizás unos padres ambiciosos puedan hojear un catálogo de rasgos humanos deseables y hacer su pedido. Yendo más al territorio de la ciencia ficción, ¿por qué parar en los caracteres humanos existentes? Como cualquier tecnología nueva, conlleva riesgos y beneficios. Los problemas éticos podrían ser alucinantes. Pero es importante recordarnos a nosotros mismos que esto es ciencia ficción y no toda la ciencia ficción se desarrolla en la realidad: por ejemplo, sabemos que viajar en el tiempo, como lo ha imaginado Hollywood, nunca será posible. A menos que cada transferencia de un gen a un embrión se haga con 100% de eficiencia y 100% de seguridad, los intentos de una manipulación múltiple llevarán al mismo problema de muy pocas opciones en la selección de embriones. Y a menos que cada una de las 100-150 células de la masa celular interna de un blastocisto puedan ser manipuladas, el bebe resultante podría tener un bajo nivel de mosaicismo para el genotipo diseñado. En resumen, mientras nosotros estemos alerta sobre las nuevas posibilidades, el pánico moral sobre la genética no viene a cuento. En un futuro previsible, los servicios genéticos clínicos se mantendrán como una pequeña pero importante parte de la medicina normal, llevando importantes beneficios a aquellas familias que los necesiten.

14.5. Referencias

American Society of Human Genetics (1975) Genetic counseling. *Am. J. Hum. Genet.* **27**: 240–242.

Bachoud-Lévi A-C, Gaura V, Brugieies P *et al.* (2006) Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study. *Lancet Neurol.* **5**: 303–309.

Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, *et al.* (2002) Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. *Prenat. Diag.* **22**: 609–615.

Chiu RWK y Lo YMD (2004) The biology and diagnostic applications of fetal DNA and RNA in maternal plasma. *Curr. Topics Dev. Biol.* **61**: 81–111.

Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F *et al.* (2002) Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by *ex vivo* gene therapy. *New Engl. J. Med.* **346**: 1185–1193.

Modell B, Ward RH y Fairweather DV (1980) Effect of introducing antenatal diagnosis on reproductive behaviour of families at risk for thalassaemia major. *Br. Med. J.* **280**: 1347–1350.

Munnich A (2006) Advances in genetics: what are the results for patients? *J. Med. Genet.* **43**: 555–556.

Tibben A (2002) Genetic counseling and presymptomatic testing. In: *Huntington Disease*, 3rd edition, eds Bates G, Harper PS and Jones L. Oxford University Press, Oxford.

14.6. Ejercicios de autoevaluación

(1) Una mujer tiene un hermano con distrofia muscular de Duchenne. No hay casos previos en la familia, no hay otros niños y la madre tiene un único hijo. Ella podría ser portadora o el niño podría tener una nueva mutación. Calcular la probabilidad de que ella sea portadora. (Ver la *Guía de los ejercicios de autoevaluación* para las dos formas de hacer este importante cálculo.)

(2) Estos cálculos emplean el riesgo de portador 2/3, calculado en la cuestión previa. La mujer tiene otro hijo, esta vez una niña. Calcule el riesgo de que la niña sea portadora.

(3) La mujer del ejercicio 2 tiene dos hijos más, dos varones no afectados. ¿Esto altera su estimación del riesgo de que sea portadora? Utilice el cálculo bayesiano para revisar su riesgo.

(4) Un hombre pertenece a una extensa familia en la cual una enfermedad autosómica dominante es segregada. Su madre está afectada pero él está sano. La enfermedad tiene un 90% de penetrancia, por lo que él no habrá heredado el alelo de la enfermedad o podrá ser un caso no penetrante. Calcular el riesgo de que su primer hijo esté clínicamente afectado por la enfermedad.

(5) Generalizar el resultado del ejercicio 4 para un enfermedad con penetrancia x, y calcular el riesgo máximo de que una persona tenga un hijo afectado, si x tuviera cualquier valor.

(6) Su madre tiene la enfermedad de Huntington y usted está sano con 45 años de edad. Si la mitad de las personas que han heredado el gen de la enfermedad muestran síntomas a la edad de 45 años, ¿cuál es la probabilidad de que usted haya heredado el gen de la enfermedad?

(7) Diga si cada una de las siguientes afirmaciones son verdaderas o falsas:

(a) El riesgo empírico es usado en consejos para enfermedades no mendelianas.

(b) Los riesgos empíricos están basados en simplificaciones matemáticas.

(c) Los riesgos empíricos no incorporan asunciones de los mecanismos genéticos.

(d) Los riesgos empíricos son válidos solo para una población y tiempo determinados.

(8) Esboce propuestas para desarrollar la terapia génica en (a) fibrosis quística, (b) distrofia muscular de Duchenne y (c) crecimiento rápido de tumor cerebral. En cada caso, considere las ventajas y desventajas de estas enfermedades como diana para la terapia génica, para el/los gen(es) y decida cómo lo haría, en qué tejido o células lo realizaría y cómo.

Guía de los ejercicios de autoevaluación

Capítulo 1

Ejercicios 1, 2 y 3. Siguiendo las dos preguntas sugeridas en el texto debería llegar a una respuesta convincente. Hemos hablado de que cada enfermedad es rara, así como la probabilidad de que una persona no relacionada que se casa con alguien de la familia sea portador (si la enfermedad es recesiva) es pequeña.

Árbol genealógico 3. A diferencia de los otros árboles genealógicos de este libro, este muestra una familia real. La enfermedad es hemofilia A (OMIM 306700) y la familia es la de la reina Victoria. La reina Victoria es I-2. Las personas afectas son Leopoldo (II-1), Federico (II-8), Leopoldo y Maurice Mountbatten (III-18, III-19), Rupert (IV-2), Alexis, Zarevich de Rusia, asesinado junto a sus cuatro hermanas por los bolcheviques en 1918 (IV-8), Waldemar y Henry de Prusia (IV-9, IV-11), y Alfonso y Gonzalo de España (IV-14, IV-19). V-1 es la actual reina Isabel II de Inglaterra.

Ejercicio 4. Este árbol genealógico es ambiguo (no deberían ponerle uno así en un examen). Trate cada modo de herencia posible. No deje que le lleve a conclusiones erróneas por las mujeres afectas, y no salte a la conclusión de que se trata de una transmisión varón–varón. Un varón afecto tiene un hijo afecto, pero ¿está seguro de que el hijo hereda el gen de la enfermedad de su padre? El riesgo para un hijo de IV-3 puede depender de cuál sea el modo de herencia correcto.

Capítulo 2

Ejercicio 1a. Considere los sucesos en la ovogénesis que podrían resultar en una pérdida del X (huevo fertilizado por un espermatozoide portador de un X) y los sucesos en la espermatogénesis que llevan a un espermatozoide con pérdida de X o pérdida de Y. Observe que, en realidad, el síndrome de Turner es el resultado de una pérdida en anafase o de una no-disyunción.

Ejercicio 2a. Empleando la *Figura 2.8* para ver si los puntos de rotura son proximales (cerca del centrómero) o distales (hacia los telómeros) en el brazo del cromosoma. 2q22 está en el primer cuarto del brazo largo del cromosoma 2 y 4q32 está tres cuartos hacia abajo en el brazo largo del cromosoma 4. Dibuje el tetravalente en forma de cruz cuando los dos cromosomas traslocados se emparejan con sus dos parejas normales. Dibújelo a escala, usando diferentes colores para las secuencias de los cromosomas 2 y 4. Compruebe que siempre ha emparejado segmentos del mismo color. Después dibuje los posibles gametos. Puede considerar tanto el patrón de segregación 3:1 como el 2:2, como se muestra en la *Figura 2.17.*

Capítulo 3

Ejercicio 2 CTCAAAAGCACGCTCCAGTTCCTCCAGCTG
CAGCUGCAGGAACUGGAGCGUGCUUUUGAG

Recuerde que las cadenas son antiparelelas, pero que siempre se escriben en dirección 5′→3′.

Ejercicio 3. La trascripción comienza en el inicio del exón. El primer codón es el codón de iniciación AUG. El intrón 1 comienza al final del exón 1.

Ejercicio 4. Podría utilizar un procesador universal para interpolar y alinear las dos secuencias o bien compararlas manualmente. Las secuencias presentes en el ADN genómico, pero ausentes en el ARNm, son intrones.

Capítulo 4

Ejercicio 1a. Primero pregúntese: para tener un producto de 50 pb, ¿tienen los cebadores que flanquear la secuencia de 50 nt subrayada o deben estar dentro de ella? Escriba la cadena complementaria para las regiones donde sus cebadores anillarían. Luego ponga en todos las direcciones 3′ y 5′ y recuerde que el cebador se va a extender desde ellos hacia el extremo 3′.

Ejercicio 4. Imagine que tiene una copia de cada una de las secuencias posibles de n nucleótidos de longitud. Habrá 4^n secuencias, por lo que el tamaño total será de $4^n \times n$. Busque un valor de n de tal manera que el total sea> 3.000.000.000. Por supuesto, este ejercicio ignora el hecho de que el genoma humano no es una secuencia al azar, y que contiene muchas secuencias repetidas, pero muestra que una secuencia no necesita ser demasiado larga para ser *potencialmente* única dentro del genoma humano.

Capítulo 5

Ejercicio 2. La hibridación es una propiedad del ADN de cadena sencilla. El ADN de doble cadena no hibrida con ninguna otra cosa.

Ejercicio 3. Recuerde que las secuencias deben ser leídas de 5′→3′. CTTAAG no es un sitio de unión de EcoRI. Si escribe la cadena complementaria, se dará cuenta de que GAATTC, como la mayoría de los sitios de restricción, es palindrómico; esto quiere decir que se lee igual en las dos cadenas.

Capítulo 6

Ejercicio 1. Pregunte si cada cambio podría, específicamente, causar fallo en el trasporte de los canales de iones en la membrana apical de la célula.

Ejercicio 2. Dos de los cambios son deleciones de uno o unos pocos nucleótidos. Un cambo afecta al sitio de corte.

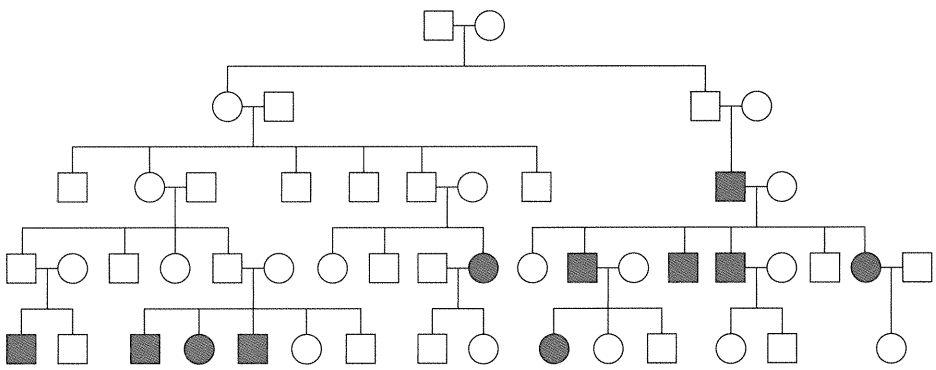
Ejercicio 3. Un laboratorio podría informar de la variante de la última secuencia como p.V29M pero, de hecho, podría muy bien afectar al *splicing*; sustituya

el último nucleótido del exón 1, y una G en esta posición es parte del la secuencia normal de consenso del sitio de corte.

Ejercicio 4. c.216C>G es una mutación de sentido cambiado, p.172M; crea un codón metionina interno. Esto no es un codón iniciador: la translación se inicia en el primer AUG adecuado en el ARMm y, una vez iniciada, los demás AUGs se leen como codones metionina normales.

Capítulo 7

Ejercicio 1. Aquí hay uno de los posibles árboles genealógicos. La enfermedad es autosómica dominante, por lo que afecta a ambos sexos y el gen mutante puede ser transmitido por ambos sexos, pero siempre es no penetrante cuanto se hereda de la madre.



Ejercicio 6. Esta es la secuencia que reconoce el cebador dando lugar al producto de 313 pb de la *Figura 7.14*. Puede ver todas las secuencias en el artículo de Zeschnigk *et al.* (1997).

Ejercicio 7. Hay un entrecruzamiento obligatorio en cada meiosis masculina entre las copias de las regiones pseudoautosómicas Xp e Yp. El punto de entrecruzamiento puede ser distal o proximal a la localización del marcador. Puede tratar de asumir que el 50% de los entrecruzamientos están localizados entre el centrómero y el locus del marcador. En las meiosis femeninas no son frecuentes los entrecruzamientos dentro de esta región.

Capítulo 8

Ejercicio 2. Considere los posibles bloqueos en una ruta multipaso, o un bloqueo en el procesamiento post-traduccional (ver *Sección 8.4*).

Ejercicio 5. Eliza es homocigota para HLA-B27 y para HLA-DR4. Necesita utilizar el último hecho para resolver el alelo DR en cada haplotipo.

Capítulo 9

Ejercicio 1. Aunque cada meiosis puede ser recombinante o no recombinante, solo las meiosis en la madre de la tercera generación son informativas. El resultado de la χ^2 (3.6, 1 d.f) es casi significativo en el nivel 5%, mientras que el *lod score* está muy por debajo del umbral de significancia [L1= $(1/2)^{10}$; L2 = $(1 - \theta)^8.(\theta)^2$; *lod score* máximo = 0,83 a θ= 0,2]. La razón es que el *lod score*, pero no el test de la χ^2, tiene en cuenta la prioridad de ligamiento más baja. Esto quiere decir que, si tomamos al azar dos loci, la probabilidad de que muestren ligamiento es de 1 de cada 50; probablemente se encuentren en cromosomas diferentes e, incluso si estuvieran en el mismo cromosoma, podrían estar lo bastante separados como para no mostrar ligamiento. El sentido común nos dice que necesitamos tener una mayor cantidad de probabilidad cuando queremos creer o no en algo. Por ejemplo, creería a un amigo si le dice que no ha venido a clase porque se ha quedado dormido, pero no le creería si le dijera que no ha venido porque fue abducido por unos extraterrestres. Véase Strachan y Read, *Genética molecular humana* (*Capítulo 11* en la 2ª edición, disponible en internet; *Capítulo 13* en la 3ª edición) para obtener una explicación más amplia de cómo el umbral del *lod score* incluye la probabilidad anterior o vea Ott *Análisis of Human Genetic Linkage* para más detalles.

Ejercicio 2. Resuelva los haplotipos, comenzando con la generación 2. Los marcadores alélicos han sido elegidos en este ejemplo para permitir que no haya haplotipos ambiguos que puedan ser asignados a cada individuo. Puede identificar entonces qué haplotipo del individuo II-1 está ligado al locus de la enfermedad (recuerde que se ha dicho que la enfermedad está ligada a esta región cromosómica). Después, cuando examine los haplotipos paternos de la generación III, podrá ver que los individuos III-3 y III-5 han heredado los haplotipos paternos recombinantes portadores de la enfermedad. La posición de entrecruzamiento muestra que el locus de la enfermedad tiene que mapear por debajo del marcador A (desde II-3), pero encima del marcador C (desde III-5). El individuo III-6 tiene el haplotipo recombinante de la madre. El entrecruzamiento puede estar en cualquier lugar entre los marcadores A y D. Esta recombinación no aporta ningún dato para poder mapear el locus de la enfermedad.

Ejercicio 4. Se sabe que, en ocasiones, la combinación de sordera y diabetes está causada por mutaciones en el ADN mitocondrial. Aunque NB es sensible a este tipo de priorización, cuando se encuentra al fin el gen que lo causa, a menudo no es uno de los candidatos más obvios.

Capítulo 10

Ejercicio 2. Recuerde que solo las personas homocigotas para uno u otro alelo son afectas; las personas heterocigotas para dos o más loci son sanas. En realidad, como se explicó, sería imprudente fiarse de las figuras de Hardy-Weinberg para tales enfermedades recesivas.

Ejercicio 3. Podría tratar de resolver esto, diciendo $p^2 + 2pq = 0,64$; sustituyendo (1-p) por q, y obtendría una ecuación de segundo grado para resolver p. Se puede hacer, pero es más fácil empezar observando que $q^2 = 0,36$

Ejercicio 4. Considere la primera parte como un problema de Hardy-Weinberg con 3 alelos, como en el *Cuadro 10.1*, sin funcionamiento, con bajo funcionamiento y con alelos normales.

Ejercicio 5. Recuerde la diferencia entre portadores obligados y los posibles portadores.

Ejercicio 6. El consejo genético no es directivo.

Capítulo 11

Ejercicio 4. Calcule los números relativos contando los cuadros bajo la parte apropiada de cada curva. Las curvas se han dibujado con áreas totales iguales, pero recuerde que la curva para NTD realmente debería tener 1/100 del área de la curva normal.

Ejercicio 5. El riesgo, antes de cualquier cribado, de que en una pareja ambos sean portadores es 1/40 x 1/40 = 1/1 600. Necesitamos calcular la sensibilidad de un test de tal forma que cuando el análisis del cónyuge sea negativo, solo haya 1 posibilidad entre 1600 de que sea un falso negativo. Puede ver en la *Tabla 11.1* que esto no se alcanza fácilmente.

Capítulo 12

Ejercicio 1. En referencia a la afirmación 8, aunque suele ser verdad que las mutaciones en los oncogenes son somáticas y no hereditarias, hay algunas excepciones. Las mutaciones heredadas en el encogen *RET* se encuentran en el cáncer de tiroides familiar. Si un producto de un gen tiene más de una función, puede ser simplista hablar solo de pérdida o ganancia de función. Igualmente, la clasificación de los genes en oncogenes y genes supresores de tumores es una herramienta muy útil en la patología molecular del cáncer, pero tiene sus limitaciones.

Ejercicio 3. Si la probabilidad de una mutación en una célula es μ y hay n células, la probabilidad de que una célula no sufra una mutación es $(1- \mu)^n$. Ya que μ es muy pequeño, se aproximará a $1-n\mu$, y es igual a la posibilidad de no penetrancia en un caso familiar. Es interesante que en orden a obtener una combinación de la penetrancia real y la frecuencia real de casos esporádicos con este simple cálculo, es necesario postular una alta tasa de mutación irreal. Quizás una mutación somática afecta a las células diana de un modo tal que hace más probable una segunda mutación.

Ejercicio 4. Usando el sistema de puntuación de la *Tabla 12.4*, simplemente añadiendo puntos en cada uno de los árboles genealógicos, da un 12% de posibilidad de mutación de *BRCA1* en una familia A y la posibilidad del 14% en una familia B. Pero los 12 puntos de la familia A vienen del lado paterno, mientras que en la familia B del lado paterno tiene 9 puntos y

del lado materno tiene 5. Si hay una mutación, es más probable que venga del padre, pero la probabilidad es solo del 9%. Por supuesto, este es un ejemplo artificial.

Capítulo 13

Ejercicio 1. Los hábitos alimentarios familiares podrían ser aprendidos o genéticos. Los gemelos de sexos opuestos son siempre dicigóticos, mientras que los gemelos del mismo sexo pueden ser monocigóticos o dicigóticos. Las primeras tres observaciones sugieren factores genéticos. Los datos de adopción dan lugar a una separación bien definida de la genética y los efectos medioambientales, aunque la hipótesis de Baker (ver *Capítulo 7*) avisa en contra de conclusiones dogmáticas.

Ejercicio 2. Ya que la enfermedad es más común en hombres que en mujeres, el riesgo es siempre mayor para un hijo que para una hija de una persona determinada. La lógica del *Cuadro 13.1* dicta que el riesgo es mayor para un hijo de una mujer afecta que para un hijo del mismo sexo de un hombre afecto. Como Betty tiene dos parientes masculinos de primer grado afectos, es probable que tenga una mayor susceptibilidad que Anne, así que el riesgo para sus hijos es mayor.

Ejercicio 3. Si la fracción de recombinación es θ, tras n generaciones una proporción $(1-\theta)^n$ permanece asociada.

Ejercicio 7. Este es el problema del análisis múltiple y la corrección de Bonferroni es apropiada. En ocasiones es difícil decidir cuántas preguntas hacer. Si un marcador tiene n alelos, y analiza cada uno para asociación, una de las preguntas es: ¿n o n-1? La corrección de Bonferroni es demasiado rigurosa si las preguntas no son completamente independientes. Si busca no solo asociaciones con alelos marcadores individuales, sino también con haplotipos multimarcador, ¿son estas preguntas independientes? Si utiliza el análisis de ligamiento y sabe que hay loci de susceptibilidad en algún lugar del genoma, cada resultado negativo reduce el área del genoma donde los factores de susceptibilidad deben estar escondidos; ¿son independientes los tests de las pocas áreas restantes? En pocas palabras, el problema del análisis múltiple es grave en los estudios de las enfermedades complejas y requiere una estadístico experto.

Ejercicio 9. Para los padres 2–1 × 1–1 las proporciones mendelianas entre los hijos deben ser modificadas por el hecho de que ha seleccionado parejas en las que ambos miembros son afectos. Se hace más fácilmente con un cálculo bayesiano, con las proporciones mendelianas como probabilidad inicial y que los dos hermanos estén afectos como probabilidad condicional.

Genotipos de los hermanos	(1-1, 1-1)		(1-1, 2-1)		(2-1, 2-1)
Probabilidad previa	¼		½		¼
Probabilidad condicional (ambos afectos)	16	:	8	:	4
Probabilidad combinada	4	:	4	:	1
Probabilidad final	4/9		4/9		1/9

Para una explicación de este método, ver *Cuadro 14.1*.

Capítulo 14

Ejercicio 1. Este es un importante cálculo básico de la estimación del riesgo genético, como vimos en detalle. Hay dos modos de llegar a la respuesta, que se aplican a enfermedades recesivas ligadas al X donde los hombres afectados nunca se reproducen.

(a) Si la población contiene igual número de hombres, cada uno tiene un cromosoma X, y de mujeres, cada una dos, entonces un tercio de todos los cromosomas X está en los hombres. Igualmente, un tercio de todos los cromosomas X con DMD está en los hombres. Cualquier cromosoma X con DMD que está en hombres no se trasmitirá a la siguiente generación, y entonces un tercio de todos los X con DMD se pierden en cada generación. Si la frecuencia de la enfermedad permanece constante a través de las generaciones, debería estar equilibrada por nuevas mutaciones. Por lo tanto, un tercio de los casos son nuevas mutaciones, y la probabilidad de que la madre de un caso aislado sea portadora es de 2/3.

(b) Un método alternativo empieza por calcular la probabilidad de que cualquier mujer, escogida completamente al azar, sea una portadora de DMD. Llamémoslo probabilidad *P*. Supongamos que tiene una hija. La probabilidad de que la hija sea portadora se hace en tres partes:

- Podría ser portadora porque su madre es portadora y ha heredado de su madre el X mutado. La probabilidad de esto es $P/2$.
- Podría ser portadora porque, auque su madre no sea portadora, el X que ella recibió lleva una nueva mutación DMD. Llamemos a esta probabilidad "de mutación μ".
- Podría ser portadora porque el X que recibió de su padre lleva una nueva mutación DMD. De nuevo la probabilidad de esto es μ.

El riesgo global de que su hija sea portadora es $P/2+2\mu$. Pero nuestra mujer original fue seleccionada completamente al azar; exactamente la misma lógica podría haber sido aplicada a ella y a su madre. El riesgo de ser portadora de la madre y de la hija realmente debería ser el mismo (si no lo fuera, repitiendo el ejercicio en suficientes generaciones, podría llegar al riesgo de 0% o 100%, lo que sería absurdo). Por consiguiente, $P=P/2+2\mu$, de lo que se obtiene $P=4\mu$.

Ahora que hemos calculado la probabilidad previa de que una mujer sea portadora de DMD, podemos volver a la pregunta original y hacer un cálculo bayesiano del riesgo de que una mujer que tiene un hijo con DMD sea portadora. Tanto si es portadora como si no lo es, el cálculo sería como sigue:

La mujer es:	portadora	no portadora
Probabilidad previa	4μ	$1-4\mu \approx 1$
Condicional: hijo afectado	½	μ
Probabilidad conjunta	2μ	μ
Probabilidad final	$2\mu/3\mu = 2/3$	$\mu/3\mu = 1/3$

Ejercicio 2. El riesgo de la hija es la mitad del riesgo de la madre: hay 1 de cada 2 probabilidades de que herede el X de "riesgo" de su madre en vez del otro.

Ejercicio 3.

- *Método 1*: repetir el cálculo del ejercicio 1, añadiendo una línea extra de condicionales para los dos hijos sanos. Conociendo que es portadora, la probabilidad de tener dos hijos no afectos es de 1 por cada 4. Si no es portadora, es 1-2μ, lo cual es efectivamente 1.
- *Método 2*: empezar con el riesgo de 2/3 de que es portadora como probabilidad previa. En este caso, ya se ha utilizado la información de que tiene un niño afectado, por lo que la única probabilidad condicional es para los hijos no afectados.

  Esto ilustra el hecho de que no importa qué piezas de la información coloque como probabilidad previa y cuáles como condicional; solo que cuando se emplea una pieza de información se usa solo una vez y solo una.

Ejercicio 4. Primero necesita calcular la probabilidad de que el hombre sea un portador no penetrante empleando un cálculo bayesiano. La probabilidad previa es su riesgo mendeliano de 1 por cada 2; la condicional es el hecho de que no está clínicamente afectado. Una vez obtenido su riesgo, el riesgo de que sus hijos hayan heredado los genes de la enfermedad es la mitad del riesgo del que el padre sea portador. Recuerde que, incluso si el niño hereda el gen, hay solo un 90 % de probabilidades de que esté clínicamente afectado.

Ejercicio 5. La fórmula es $\frac{1}{2} x \frac{(1-x)}{(2-x)}$. La respuesta, un riesgo de 8,6% para 59% de penetrancia, es sorprendente y tranquilizadoramente baja. Si una enfermedad tiene baja penetrancia, aumenta el riesgo de que un padre no afectado pueda llevar el gen de la enfermedad pero, al mismo tiempo, se reduce el riesgo de que el niño esté clínicamente afectado si hereda el gen.

Ejercicio 6. La respuesta "obvia", 1 por cada 4, es errónea. Emplee Bayes para obtener la respuesta correcta.

Glosario

Acoplamiento dirigido: elección de un compañero genéticamente similar. Puede basarse en tener un fenotipo similar o en estar relacionados por familiar.

Acrocéntrico: cromosoma que tiene el centrómero próximo (pero no del todo) a uno de los extremos. En humanos, los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22.

Actuación en trans: de un elemento regulador genético, regulando un gen o genes que se encuentran en otra parte en el genoma (normalmente haciendo un producto regulador difusible).

ADNc o cDNA: ADN complementario; copia en ADN del ARN mensajero mediante una transcriptasa inversa. El ADNc humano representa solo del 1% al 3% del ADN genómico, pero contiene la mayor parte (aunque no todas) de las secuencias clínicamente relevantes. A diferencia del ADN, el ADNc es específico del tejido.

ADN recombinante: ADN producido mediante la unión de secuencias derivadas de diferentes fuentes, normalmente, una secuencia humana de interés ligada a un vector.

Alelos: formas alternativas de un gen.

Anafase: fase de la división celular (mitosis o meiosis) en donde los cromosomas o las cromátidas se separan y son empujadas a los polos opuestos de la célula.

Análisis de ligamiento no paramétrico: análisis de ligamiento que está basado en la importancia por la que familiares afectos comparten segmentos cromosómicos, pero no depende de un modelo específico que causa el fenotipo (*ver Sección 13.2*).

Aneupliodía en una célula: no **euploide**; que presenta pérdida o ganancia de cromosomas.

Anillamiento de cadenas complementarias sencillas de ácidos nucleicos: para hibridar formando una doble hélice de bases emparejadas.

Anticipación: la tendencia de una enfermedad a convertirse en más grave, más frecuente o comenzar a una edad más temprana, en las sucesivas generaciones. A menudo es un artefacto debido a los métodos de averiguación.

Apoptosis: mecanismo específico por el que la célula se mata a sí misma.

Array de expresión: un microarray de oligonucleótidos o ADNcs que hibridan con ARNms o ADNcs individuales. Cuando se hibrida ADNc procedente de una célula o tejido, el patrón de hibridación refleja el repertorio de ARNms que se encuentran en ese material (ver *Sección 4.4* y *12.4*).

Asociación: tendencia estadística de dos cosas a ir juntas de manera más o menos frecuente que si fuera aleatoriamente. La combinación se da en una frecuencia que no es igual al producto de sus frecuencias individuales.

Autosoma: cualquier cromosoma que no es un cromosoma sexual X o Y.

Bandeo G: procedimiento estándar en el que los cromosomas son tratados de tal manera que se quedan con un patrón característico y reproducible de bandas oscuras y claras, como se muestra en el *Figura 2.5*.

Cadena efectora: en un gen la cadena de la doble hélice cuya secuencia corresponde a la secuencia del ARN mensajero (la opuesta a la cadena plantilla).

Cadena molde: en un gen, la cadena de la doble hélice cuyas bases se aparean con el ARN naciente durante la transcripción.

Candidato posicional: en la identificación de genes de enfermedad, un gen localizado en una región cromosómica identificada mediante ligamiento que contiene un gen de la enfermedad.

Carácter cuantitativo: un carácter como la presión sanguínea que todo el mundo tiene, pero que varía en su magnitud. A veces se denomina *carácter continuo.*

Caracteres dicotómicos: caracteres en personas sanas o en una enfermedad, que algunas personas tienen y otras no (tb. *caracteres cuantitativos* o *continuos*, que tienen todas las personas).

Cariograma: es el término correcto para visualizar los cromosomas de una persona, como en la *Figura 2.9.* Normalmente llamado *cariotipo.*

Cariotipo: constitución cromosómica de una persona; también se usa con poco rigor para describir la imagen de los cromosomas de una persona, como en la *Figura 2.9*, etc.

Cascada de búsqueda: averiguación de portadores de genes mediante análisis sistemáticos de toda la familia de una persona afecta (ver *Cuadro de enfermedad 11*).

Cebador *(primer)*: es un oligonucleótido (10 a 40 nucleótidos) que en la síntesis de ADN hibrida con la cadena simple de ADN y mediante la ADN polimerasa se extiende añadiendo nucleótidos en su extremo 3'.

Célula madre *(stem cell)*: célula capaz de autorreplicarse y de dar lugar a gran variedad de linajes celulares diferenciados (ver *Figura 14.5*).

Célula madre embrionaria: célula madre totipotencial que se obtiene del interior de la masa celular de un blastocisto (ver *Figura 14.6*).

Centrómero: punto donde se unen las cromátidas hijas de un cromosoma replicado, y la localización del cinetocoro, al que se unen las fibras del huso durante la división celular. Marcado por la heterocromatina que contiene una variante especial de histona la H3, la proteína CENP-A.

Clonación posicional: identificación de un gen de enfermedad a través del análisis de ligamiento seguido de un análisis posicional de candidatos para mutaciones; comparable a identificar el gen de la enfermedad a través de la investigación en la patogénesis.

Clonación reproductiva: procedimiento que pretende producir un bebé clonado (ver *Sección 14.4*).

Clonación terapéutica: procedimiento cuyo objetivo es producir células madre embrionarias genéticamente emparejadas con un paciente, para obtener células o tejidos para el trasplante (ver *Figura 14.7*).

Codón de parada: en el ARN mensajero, un codón UAG, UGA o UAA señaliza al ribosoma para que se disocie y cese la extensión de la cadena polipeptídica de la secuencia correspondiente en un gen.

Coeficiente de endogamia o consanguinidad: la probabilidad de que una persona sea homocigota para cualquier locus dado debido a la consanguinidad de sus padres. Igualar a la mitad del coeficiente de parentesco de los padres.

Coeficiente de parentesco: la proporción de genes que dos personas comparten debido a que tienen ancestros comunes que se pueden identificar (ver *Sección 10.2*).

Congénito: presente en el nacimiento; no es necesariamente genético.

Conversión de un gen: proceso en el que una pequeña longitud (normalmente 100 pb) de la secuencia en un gen está reemplazada con una secuencia similar, pero no idéntica, de otro alelo o gen. Es un proceso recombinante pero no recíproco: el gen donante no cambia.

Corrección de Bonferroni: corrección estadística rigurosa para los tests múltiples, consistente en multiplicar el valor P para una observación por el número de diferentes preguntas hechas.

Cromátida: una doble hélice de ADN simple empaquetada en un cromosoma. Los cromosomas normalmente existen como una cromátida simple, pero cuando se va a producir la división celular se unen a su cromátida hermana mediante el centrómero.

Cromátidas hermanas: las dos cromátidas de un cromosoma tal y como se ven en una célula en división. Las cromátidas hermanas son copias una de la otra, hechas durante la ronda de replicación del ADN precedente.

Cromatina: término general para nombrar el complejo ADN-proteína del que están compuestos los cromosomas.

Cromatografía líquida de alto rendimiento parcialmente desnaturalizante (dHPLC): método de análisis del producto de PCR y otros fragmentos de doble cadena en busca de cambios, comparados con un fragmento referencia, analizando la velocidad con la que pasan a través de una columna.

Cromosomas homólogos: los dos cromosomas nº1, etc., de una persona. Los cromosomas homólogos contienen la misma matriz de loci, pero diferentes cromátidas hermanas que no son copias una de otra. Hay algunas diferencias en pequeños tramos (diferencias menores de secuencias de ADN) o en algunas ocasiones en grandes tramos (debido a traslocaciones, etc.).

Degradación mediada sin sentido: un mecanismo en las células que rompe la mayoría de las moléculas de ARNm que contienen un codón de parada localizado a más de 50 nucleótidos hacia arriba del sitio de corte más cercano a 3′. Probablemente implica proteger las células contra efectos negativos dominantes de proteínas truncadas (ver *Figura 6.3*).

Deriva genética: un cambio en la frecuencia de los genes entre generaciones debido a diferencias al azar entre la frecuencia de genes en una generación y de los genes de los gametos que producen la siguiente generación. Solo sucede si el número de gametos es pequeño.

Desequilibrio: de una anomalía cromosómica, que tiene material sobrante o perdido en vez del material correcto traslocado.

Desnaturalización: separación en las dos cadenas de la doble hélice del ADN mediante calor o pH alto; también llamado "*melting*".

Dideoxinucleótido (ddNTP): nucleótido modificado químicamente utilizado en la secuenciación del ADN para terminar las cadenas crecientes (ver *Figura 5.2*).

Dinucleótido CpG: una citosina que se encuentra inmediatamente antes de una guanina en el ADN. Es la diana de las enzimas de metilación del ADN y un "punto caliente" para las mutaciones CpG→TqG.

Diploide: en una célula u organismo, tener dos genomas. El estado normal de las células somáticas humanas.

Disomía uniparental: dos copias de un par cromosómico heredado del mismo progenitor. En la isodisomía las dos copias son del mismo cromosoma parental, en tanto que en la heterodisomía ambos cromosomas de ese progenitor están presentes.

Distribución de Hardy-Weinberg: las relaciones matemáticas entre la frecuencia de genes y la de genotipos vistas cuando no hay factores de distorsión. Pocas veces se aplica en humanos con enfermedades recesivas raras en los que muchos casos son debidos a consanguinidad.

Dominante negativo: una mutación donde el producto del alelo mutante interfiere con la función del producto normal en heterocigosis.

Dominante: un carácter es dominante si se manifiesta en heterocigosidad. La dominancia o la recesividad son propiedades de los caracteres, no de los genes o alelos.

Dosis sensible: en un gen, donde el número de copias diferente a cero tiene efecto sobre el fenotipo.

***Dot blot* reverso**: un *dot blot* en el que la sonda está inmovilizada en un soporte sólido. Los **microarrays** de ADN son masivamente *dot blots* reverso paralelos.

Dot blotting: test de hibridación en el que tanto el ADN a estudiar como la sonda son inmovilizados en un punto de un soporte sólido.

Downstream: en una cadena de ácidos nucleicos, en la dirección 3′ (de la cadena sentido de un gen).

Efecto fundador: alta frecuencia inusual de un alelo particular o haplotipo en una población que desciende de un pequeño número de fundadores, de los cuales uno o más deberían de haber sido portadores de la secuencia.

Emparejamiento al azar: elección de emparejamiento no relacionado con el genotipo; es lo opuesto a **emparejamiento dirigido**.

Endonucleasa de restricción: enzima que corta la doble cadena de ADN en una secuencia específica, normalmente un palíndromo de 4 o 6 nucleótidos.

Enfermedad común, hipótesis de la variante común: hipótesis de que la mayoría de los factores genéticos de susceptibilidad para las enfermedades complejas comunes son variantes antiguas que son frecuentes en la población general. Las hipótesis subyacentes intentan identificar los alelos susceptibles mediante estudios de asociación. La hipótesis contraria es que la susceptibilidad está unida a una recogida heterogénea de mutaciones recientes.

Enfermedad de depósito lisosomal: un error innato del metabolismo donde los lisosomas no son capaces de degradar cierto tipo de material. Como resultado, el material se acumula en los lisosomas, conduciendo a efectos patológicos.

Enfermedad de la cromatina: enfermedad causada por fallos en la regulación de la estructura de la cromatina (ver *Cuadro de enfermedad 2*).

Enzimas de restricción sensibles a la metilación: enzima de restricción como *Hpa*II que solo cortará sitios reconocidos como desmetilados (ver *Sección 7.2*).

Epigenética: creación de cambios en la expresión génica heredables (de célula a célula hija, o en algunos casos de generación en generación) sin que cambie la secuencia de nucleótidos. Realizado mediante metilación del ADN y/o por cambios en la estructura de la cromatina.

Epimutación: mutación que causa un cambio epigenético pero no un cambio en la secuencia de ADN.

Episoma: elemento genético extracromosómico.

Equilibrado: de la composición cromosómica, no tener nada extra o que falte. También utilizado libremente en las traslocaciones robertsonianas, incluso cuando están implicadas pérdidas de parte de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos.

Eucromatina: cromatina con una estructura relativamente abierta en la que los genes pueden ser activados si los factores de transcripción y los coactivadores necesarios están presentes; lo contrario de heterocromatina.

Euploide: en una célula, contiene el número completo de juegos cromosómicos, sin que falte o sobre ningún cromosoma.

Exón: segmento de ADN genómico que se corresponde con la secuencia de un ARNm maduro. Los exones incluyen unas regiones 5′ y 3′ que no se traducen de un gen, así como la secuencia codificante.

Factor de transcripción: proteína cuya acción es facilitar la transcripción de un gen o genes ayudando a llevar a la ARN polimerasa al promotor.

Familiar: se suele dar en las familias; no es necesariamente genético.

Farmacogenética: el estudio de los efectos de genes únicos en el metabolismo o en la acción de un medicamento.

Farmacogenómica: estudio genómico de las dianas terapéuticas o de los efectos de los medicamentos.

Fenocopia: un fenotipo que imita un fenotipo genético pero está producido por causas no genéticas.

Fenotipo: características observables de una persona (incluyendo el resultado de los análisis).

Fragmento de Okazaki: intermedia en la replicación de ADN. Como una horquilla de replicación se mueve a lo largo de la doble hélice una nueva cadena que crece en la dirección 5′ → 3′, puede crecer continuamente en la misma dirección siguiendo el movimiento de la horquilla, pero la otra es sintetizada a partir de un grupo de fragmentos cortos (100-200 nucleótidos) que son posteriormente ligados juntos.

Frecuencia de un gen: la frecuencia de un alelo A_n es la proporción de todos los alelos del gen A en una población determinada que es A_n.

Gen modificador: un gen que modifica el fenotipo de una enfermedad mendeliana de la cual la causa primera es un gen diferente.

Gen supresor de tumores: un gen que sufre una mutación de pérdida de función en cáncer.

Genoma: la totalidad del material genético de un organismo.

Genómica funcional: estudio de las funciones de todos los genes de un genoma o de todos los genes que se expresan en una célula o tejido.

Genómico: de ADN, el ADN como se presenta en el núcleo celular, en contraste con el ADNc.

Haploide: de una célula u organismo, que tiene un genoma único (p.ej., 23 cromosomas en humanos).

Haplo-insuficiencia: la condición en la que una sola copia funcional de un gen no es suficiente para producir un fenotipo normal; por ello la mutación de pérdida de función en el gen produce un carácter dominante.

Haplotipo: un grupo cerrado de alelos ligados a un cromosoma que normalmente se heredan como un bloque.

Heredabilidad: la cuantificación y distinción de que las diferencias entre personas respecto a un carácter (en una población determinada, en un tiempo determinado) se deben a diferencias genéticas entre ellas. Las heredabilidades son coeficientes de correlación, simbolizados como h^2, y que toman valores entre 0 (no influencia genética) y 1 (enteramente determinado por diferencias genéticas) (ver *Sección* 13.2).

Heterocigoto compuesto: persona con una enfermedad recesiva que tiene dos versiones mutadas del gen de relevancia diferente.

Heterocromatina: cromatina que está altamente condensada y es genéticamente inactiva. Se encuentra principalmente en los centrómeros.

Heterodúplex: una doble hélice de ADN que contiene apareamientos erróneos (ver *Figura 5.7a*)

Heterogeneidad alélica: situación en la que una enfermedad clínica puede estar causada por varias (en ocasiones muchas) mutaciones diferentes dentro de un determinado gen. Es característico de las enfermedades de pérdida de función (cf. heterogeneidad de un locus).

Heterogeneidad de un locus: la situación en la que un fenotipo clínico puede

ser causado por mutaciones en cualquiera de varios loci diferentes, cf. heterogeneidad alélica.

Heteroplasmia: de una persona, teniendo dos o más tipos de mitocondrias genéticamente diferentes.

Hibridación genómica comparativa (CGH): técnica para detectar secuencias en cualquier lugar del genoma que se encuentran presentes en un número anormal de copias (ver *Figuras 4.7* y *4.8*).

Hibridación *in situ* fluorescente (FISH): hibridación *in situ* utilizando una sonda de ADN o ARN marcada con un fluoróforo (ver *Figuras 4.6, 4.14* y *4.15*).

Hibridar: de una cadena complementaria de un ácido nucleico, anillar para formar una doble hélice emparejada por las bases.

Hipótesis un gen-una enzima: la hipótesis (definida por Beadle y Tatum en los cuarenta) de que la función de cada gen es la síntesis directa de una enzima determinada. Ahora es visto solo como parte de la historia.

Inactivación del X: el mecanismo mediante el cual, en cada célula de una persona, todos los genes de uno de los cromosomas X están silenciados; de esta forma, solo una copia de cada gen está activa, independientemente del número de cromosomas X presentes (ver *Figura 7.4*).

Inestabilidad cromosómica: acumulación de anomalías cromosómicas estructurales y/o numéricas en células anormales (p.ej., cáncer).

Inestabilidad de microsatélites: una propiedad de los tumores que son deficientes en la reparación de apareamiento erróneo causada por errores de replicación de ADN. Comparada con el ADN normal del paciente, el ADN del tumor contiene nuevos alelos de muchos microsatélites a lo largo de todo el genoma.

Intrón: un segmento de un gen que es parte del primer transcrito pero no es escindido por la maquinaria del *splicing* y no es incluido en el ARNm maduro.

Inversión: una anomalía estructural en la que parte del cromosoma está en la orientación incorrecta, comparado con el resto (ver *Figura 2.19* y *4.12*).

Islas CpG: pequeñas regiones cromosómicas (normalmente menores a 1kb) donde el agotamiento normal a lo largo del genoma de los dinucleótidos CpG no ha tenido lugar. Ver *Sección 7.4* para conocer su importancia.

Isoformas de *splicing*: formas alternativas de una proteína producidas mediante el *splicing* alternativo de los exones.

Lepore: los genes tipo Lepore son genes quiméricos producidos por una recombinación no-homóloga. Viene del gen quimérico de la hemoglobina ß-δ que produce la Hb-Lepore.

Librería: en genética molecular, una colección al azar de fragmentos clonados de un conjunto de material de partida (ADN o ARNm). Los principales tipos son librerías genómicas y librerías ADNc (ver *Cuadro 4.5*).

Ligamiento: el fenómeno por el que los loci que están cercanos en un cromosoma tienden a segregarse juntos en la familia. La extensión de la tendencia (entre segregación al azar y cosegregacion invariable) mide las distancias genéticas en centiMorgans (entre 0 y 50 cM) entre los loci.

Ligamiento en desequilibrio: una población de alelos asociados particulares en dos o más loci. Se ve cuando los loci están ligados muy cercanamente y los alelos son signos de segmentos cromosómicos ancestrales compartidos.

Limitado al sexo: carácter que se ve solo en un sexo debido a razones anatómicas o fisiológicas.

Línea germinal: la línea de las células que son potencialmente trasmisibles a la siguiente generación. En humanos y otros animales la línea germinal se separa de las células somáticas muy pronto en la embriogénesis.

Lionización: inactivación del X (ver *Figura 7.4*).

Líquido amniótico: líquido que rodea al feto, contenido en el amnios.

Locus: la posición de un gen en un cromosoma; un tipo de gen (a diferencia de los alelos, que son formas variantes del mismo tipo de gen).

Locus de rasgo cuantitativo (QTL) ***(Quantitative trait locus):*** locus que contribuye al fenotipo de un carácter cuantitativo.

Lod score: la medida estadística de significancia de la evidencia por o contra el ligamiento. Igual al logaritmo (base 10) de la probabilidad de que el loci está ligado, con una fracción de recombinación dada, en vez de no estar ligado (ver *Sección 9.2*)

Mal apareamiento de cadenas por deslizamiento: un error en la replicación de una secuencia repetida en tándem que da como resultado una nueva cadena que tiene una repetición de más o de menos comparada con la plantilla.

Manifestación heterocigota: en una enfermedad recesiva ligada al X, una mujer portadora que muestra algunos signos clínicos de la enfermedad, lo más probable por que tienen inactivado su X bueno por azar en la mayoría de las células del tejido afectado.

Mapeado de autocigosidad: mapear una enfermedad recesiva en fetos de familias consanguíneas buscando un segmento compartido de cromosoma ancestral que es homocigoto en todas las personas afectas (ver *Figura 9.8*).

Meiosis informativa: en el análisis de ligamiento, una meiosis donde los genotipos permiten ser clasificados como recombinantes o no recombinantes.

Metaanálisis: análisis de los datos combinados de un número separado de estudios.

Metacéntrico: un cromosoma que tiene su centrómero en el medio (p. ej.: números 3 y 20).

Metafase: fase de la mitosis o de la meiosis inmediatamente antes de la anafase, cuando los cromosomas están máximamente contraídos y alineados en el plano ecuatorial (plano metafásico) de la célula.

Metilación: unión de grupos metilo (CH_3) a cualquier molécula, pero particularmente empleado para convertir citosinas en un dinucleótido CpG a 5-metil citosina como parte de la regulación de genes.

Método de parejas afectas (ASP): método de modelo libre de análisis de ligamiento que busca segmentos cromosómicos para emparejar en hermanos o hermanas que tienen la misma enfermedad y comparten con mayor frecuencia (ver *Tabla 13.3*).

Microarray: un soporte sólido dividido en un gran número de celdillas en cada una de las cuales ha sido anclado una muestra de reactivo específico, permitiendo que un gran número de test se hagan en paralelo. Los microarrays de oligonucleótidos, ADNsc, anticuerpos o muestras de tumores se usan ampliamente en investigación genética.

Microdeleción: una deleción cromosómica que es demasiado pequeña (<3-5 Mb) para ser vista en una preparación cromosómica estándar; detectada por **hibridación *in situ* fluorescente, hibridación genómica comparada o múltiples pruebas de amplificación ligando-dependiente.**

Microsatélites: repeticiones pequeñas en tándem de ADN donde la unidad de repetición es de 1-6 nucleótidos (repeticiones en tándem con mayores unidades de repetición se denominan minisatélites). Los microsatélites polimórficos son uno de los principales tipos de marcadores de ADN para el análisis de ligamiento.

Monosomía: tener una copia de un cromosoma determinado, pero dos de otros (p.ej., 45 en total para una monosomía autosómica).

Mosaico: tener dos o más líneas celulares genéticamente diferentes. Una persona puede ser mosaico para una variante cromosómica o un cambio en un gen.

Mosaico germinal: una persona que, debido a una mutación que ocurrió después de que fuera concebida, tiene una población de células mutantes en su línea germinal; por ello, puede producir gametos mutantes recurrentes. Es una de las mayores dificultades en la interpretación de árbol genealógico y en la estimación de riesgo.

Multifactorial: un término que describe un carácter que es determinado por muchos factores incluyendo muchos genes y factores ambientales.

Mutación de cambio de patrón: mutación que altera el patrón de lectura de una secuencia codificante (ver *Cuadro 3.3* y *Sección 6.2*).

Mutación sin sentido: una mutación que convierte un codón para un aminoácido en un codón de parada (UAA, UAG o UGA en ARNm; TAA, TAG o TGA en el ADN).

Mutación somática: mutación en una célula del cuerpo (no germinal) que no será transmitida a la descendencia.

No relacionados: todo el mundo está relacionado si se busca lo suficiente en el pasado. En genética, las personas se consideran no relacionadas si no comparten ningún bisabuelo.

Northern blot: analiza el ARN por electroforesis en gel, transfiriendo a la membrana e hibridando con una sonda marcada.

Nucleósido: una combinación de una base y un azúcar.

Nucleosoma: unidad básica de la cromatina, que comprende 146 pb de ADN enrolladas alrededor de un centro consistente en dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4.

Nucleótido: una combinación de una base, un azúcar y un fosfato.

Oligonucleótido ("*oligo*"): una pieza corta de cadena única de ADN o ARN.

Oncogén: un gen que sufre mutación de ganancia o pérdida de función en el cáncer. Aplicado estrictamente solo a la versión mutada; la versión normal se denomina protooncogén, pero esta distinción se olvida con frecuencia.

PCR en tiempo real: varios métodos mediante los cuales la acumulación de un producto de PCR se puede seguir mientras la reacción se produce. Es la base la mayoría de los ensayos de PCR cuantitativa.

Penetrancia: la probabilidad de manifestarse un carácter en un genotipo dado. La penetrancia es una propiedad de un carácter o un fenotipo, no de un gen o un alelo.

Péptido señal: residuo de aminoácidos N-terminal de una proteína que determina dónde será transportada. Los péptidos señal se eliminan una vez desarrollada su función.

Pérdida de heterocigosidad: en la investigación del cáncer, la observación de que el ADN de un tumor es aparentemente homocigoto para un polimorfismo de ADN en el que el ADN del mismo paciente es heterocigoto. Normalmente es el resultado de la pérdida de un cromosoma. Si aparece de forma repetida, implica que el cromosoma en cuestión porta un gen supresor de tumores.

Pleiotrópico: de una mutación, que tiene efectos en muchos sistemas.

Poligen: un término desafortunado utilizado en ocasiones para describir los genes responsables de un carácter poligénico. Los poligenes no son un tipo diferente de gen; son genes normales que tienen variantes con efectos menores en algún carácter en particular. Los mismos genes pueden tener efectos principales o mayores en un carácter diferente.

Poligénico: en una teoría matemática un carácter poligénico se determina por la acción combinada de un número infinito de genes, cada uno de los

cuales tiene un efecto infinitesimalmente pequeño. En realidad, los efectos poligénicos pueden ser debidos solo a un puñado de genes.

Polimorfismo conformacional de cadena única (SSCP) ***(Single Strand Conformation Polymorphism)***: método rápido y falible para analizar mutaciones en un fragmento de ADN (más de 300 nucleótidos), (ver *Figura 5.7b*).

Polimorfismo de un único nucleótido (SNP): cualquier variación polimórfica en un único nucleótido.

Pool de genes: la totalidad de genes en un locus particular en una cierta población.

Portador obligatorio: una persona cuyo árbol genealógico dice que debería ser portadora de una enfermedad recesiva (autosómica o ligada al X). En las enfermedades ligadas al X en las que es frecuente una nueva mutación, un portador obligatorio debe tener familiares afectos o portadores en su misma generación o en la previa, y entre sus hijos o nietos. Tener más de un hijo afecto no hace a la mujer portadora obligada, ya que puede tener un mosaico germinal.

Premutación: en enfermedades causadas por la expansión de repeticiones de nucleótidos, una expansión que no es lo bastante larga como para causar la enfermedad, pero sí como para desestabilizar la repetición, lo que provocará que las generaciones posteriores estén afectas (ver *Cuadro de enfermedad 4*).

Primo: en genética, se utiliza específicamente para nombrar a los primos de primer grado.

Primos de primer grado: Jack y Jill son primos de primer grado si uno de los padres de Jack es el hermano de uno de los padres de Jill.

Primos segundos: dos personas son primos segundos si sus padres son primos de primer grado.

Probabilidad inicial: en la estimación del riesgo bayesiano, la estimación inicial de cuán verosímil es cada hipótesis alternativa.

Procesamiento alternativo ***(splicing alternativo)***: opciones alternativas en las que los segmentos de un tránscrito primario de ARN se conservan en el ARN mensajero maduro (ver *Figura 3.11*).

Profase: es el primer estadio de la mitosis o meiosis; en ella los cromosomas se condensan gradualmente y se van haciendo visibles. Termina con la disolución de la membrana nuclear.

Prometafase: profase tardía de la división celular. Los citogenetistas normalmente cariotipan células mitóticas en prometafase porque los cromosomas están más extendidos que en metafase y muestran mejores bandas.

Promotor: región de ADN inmediatamente arriba de un gen en el que se ha anclado el complejo ARN polimerasa para permitir la transcripción del gen.

Proteoma: grupo completo de proteínas de una célula o un tejido.

Protooncogén: versión inactivada de un **oncogén**.

Proyecto ENCODE: un proyecto de colaboración internacional (Enciclopedia de elementos del ADN, http:/www.genome.gov/10005107) que se propone identificar todas las funciones del ADN humano (ver *Sección 6.2*).

Proyecto HapMap: un proyecto de colaboración internacional que busca catalogar todos los segmentos de cromosomas ancestrales conservados en diferentes poblaciones humanas (ver *Sección 13.4* y http://www.hapmap.org)

Prueba de amplificación múltiple ligando-dependiente (MLPA): un método para analizar simultáneamente un gran número de secuencias cortas de ADN (30-50) para observar variaciones en el número de copias. Empleado sobre todo para buscar en genes multiexón una deleción entera del exón (ver *Figura 5.8* y *5.9*).

Pseudogen: copia no funcional de un gen. Los pseudogenes son muy comunes en el genoma humano.

Punto de comprobación del ciclo celular: interacción regulatoria que evita que el ciclo celular avance hasta que se den ciertas condiciones (ver *Figura 12.8*).

Quimera: de una persona, que tiene células derivadas de dos cigotos diferentes; condición rara, lo contrario de gemelos. De un gen, producido por reordenamiento cromosómico que une exones de dos genes diferentes formando un nuevo gen. Ocurre habitualmente en el cáncer (ver *Cuadro 12.3*).

Rastreo genético: uso de marcadores polimórficos ligados para seguir la segregación de un segmento cromosómico a través de un árbol genealógico. Usado para seguir una mutación patogénica cuando, por alguna razón, no es posible analizar la mutación directamente por secuenciación (ver *Figura 9.9*).

Recesivo: un carácter es recesivo si no se manifiesta en un heterocigoto. Recesividad y dominancia son propiedades de los caracteres, no de los genes o alelos.

Recombinante: un gameto producido por una persona es recombinante para dos loci si los dos alelos que porta provienen uno de su padre y otro de su madre.

Región de control del locus: una secuencia de ADN localizada a muchas kb de distancia del sitio de comienzo de la transcripción de un gen controla la expresión de genes o grupos de genes (ver *Sección 3.4*).

Región pseudoautosómica: regiones de los extremos de los brazos cortos de los cromosomas X e Y que contienen 2,6 Mb de ADN homólogo y recombinan en la meiosis. Los genes de esta región muestran un patrón autosómico de herencia. Existe otra pequeña región pseudoautosómica en el extremo de los brazos largos (ver *Figura 7.5*).

Reparación de apareamiento erróneo: un complejo de proteínas, incluyendo las proteínas MSH2 y MLH1, chequea el nuevo ADN replicado para localizar nucleótidos incorporados erróneamente, cortándolos y resintetizando la fibra de ADN.

Repetición en tándem: secuencia de ADN repetida que está adyacente a otra. Otros tipos de repeticiones son repeticiones invertidas (o palíndromos) y repeticiones dispersas.

Rescate de trisomía: principal mecanismo de producción de la disomía uniparental. Por azar, se produce tempranamente una no disyunción mitótica en un embrión trisómico originando una célula con el número de cromosomas correcto, a partir de la cual se desarrolla todo el bebé (ver *Figura 7.16*).

Retrovirus de transformación aguda: pequeño virus de ARN, que ha sustituido parte de su genoma por un oncogén activo (ver *Figura 12.4b*).

RFLP *(Restriction Fragment Length Polymorphism)*: polimorfismo de ADN debido al cambio de un nucleótido que crea o elimina un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción (ver, por ejemplo, la *Figura 5.14*).

Riesgo atribuible a la población (fracción atribuible a la población): de una causa de enfermedad, el grado en el cual esa causa particular es responsable de la incidencia total de la enfermedad en la población.

Riesgo relativo: es el riesgo de padecer una enfermedad para una persona que tiene un genotipo específico, o una relación específica con una persona afecta, comparado con el riesgo en la población general. Observe que los riesgos relativos son bastante distintos de los riesgos absolutos. Un riesgo relativo de 10 puede no tener significación clínica si solo incrementa el riesgo absoluto de 1 cada 10.000 a 1 cada 1000.

Riesgos empíricos: riesgos definidos tras la recogida de datos, diferentes de los datos obtenidos por aplicación de la teoría genética.

RT-PCR: reacción en cadena de la transcriptasa-polimerasa inversa; es una técnica para hacer múltiples copias de ADN a partir de un ARN. Un método común para el estudio del ARN mensajero.

Secuencia 3′ no traducida: en un ARN mensajero, la parte que se encuentra después de un codón de stop.

Secuencia 5′ no traducida: en un ARN mensajero, la parte que se encuentra anterior al codón de inicio de la traducción (AUG).

Secuencia consenso: de una familia de secuencias relacionadas, la que tiene el nucleótido más común en cada posición (que puede o no ser el más común actualmente en la secuencia completa).

Secuenciación con bisulfito: método de identificación de citosinas no metiladas en el ADN; tras un tratamiento con bisulfito sódico las citosinas se convierten en uracilos, que pueden ser medidas como timinas por secuenciación (ver *Figura 7.10*).

Secuencias conservadas: secuencias que no cambian o que cambian muy poco entre especies.

Sensibilidad de un test: la proporción de personas con la enfermedad, etc., que está siendo buscada, que el test encuentra (ver Cuadro *11.1*).

Sesgo de recogida: recogida de muestras que no son estadísticamente representativas de una población más grande.

Sitio de procesamiento críptico: una secuencia en un exón o en un intrón que se asemeja a un sitio de procesamiento, pero no lo suficiente para ser utilizado como uno de ellos; una mutación puede cambiarlo de tal manera que puede ser utilizado como sitio de procesamiento ("activación de un sitio de procesamiento críptico").

Sitio frágil: en una preparación cromosómica, una región que aparece relativamente desenrollada y extendida. Normalmente solo se ve en condiciones de cultivo específicas, como tras el tratamiento con bromodeoxiuridina o afidicolina. La mayor parte de los sitios frágiles existen como variantes polimórficas no patológicas. Los sitios frágiles FRAXA y FRAXE (ver *Cuadro de enfermedad 4*) pueden ser patogénicos.

Sonda: es un fragmento de una cadena simple de ADN marcada con P^{32} o con fluorescencia, que se utiliza en los ensayos de hibridación para analizar la presencia de una secuencia complementaria.

Southern blotting: análisis de ADN mediante digestión, electroforesis en gel, transferencia a una membrana e hibridación con una sonda marcada (ver *Figura 4.5*).

Submetacéntrico: cromosoma que tiene un brazo largo y otro corto; así son la mayoría de los cromosomas humanos (los otros son metacéntricos o acrocéntricos).

Telomerasa: ribonucleoproteína que añade unidades TTAGGG a los telómeros de los cromosomas.

Telómero: estructura especial que estabiliza el final de los cromosomas; consta de complejos de proteínas específicas y secuencias de ADN TTAGGG repetidas en tándem.

Test de cribado: análisis utilizado para seleccionar personas de alto riesgo en una población. Normalmente, es seguido por un test diagnóstico (ver *Sección 11.2*).

Test de desequilibrio de transmisión (TDT): test para asociación en presencia de ligamiento. Utilizado en la identificación de factores de susceptibilidad a la enfermedad (ver *Figura 13.9*).

Test de exclusión fetal: método basado en el ligamiento para saber si un feto tiene riesgo de heredar una enfermedad de inicio tardío presente en uno de sus abuelos, sin tener que hacer un test predictivo en uno de sus padres (ver *Figura 9.10*).

Test diagnóstico: test que establece el diagnóstico de un paciente afectado por una enfermedad (tb. tests predictivos, test de búsqueda).

Test predictivo: test que demuestra si una persona actualmente sana puede desarrollar posteriormente una enfermedad de comienzo tardío.

Tránscrito primario: el producto de ARN inicial de la transcripción de un gen. Contiene todos los exones e intrones del gen. Los intrones son eliminados cuando el tránscrito primario se procesa a ARNm maduro.

Translocación: anomalía estructural en la cual dos cromosomas intercambian dos segmentos no homólogos (ver, por ejemplo, *Figura 2.14*).

Translocación robersoniana: tipo especial de translocación en la que dos cromosomas acrocéntricos se unen por el centrómero (ver *Figura 2.20*).

Transposón: un "gen saltarín": elemento genético móvil que puede moverse de una localización cromosómica a otra, bien vía escisión o haciendo una copia móvil. Se pueden ver como un tipo de virus intracelular. Los transposones se pueden reconocer mediante ciertas secuencias características. Alrededor del 50% del genoma humano consiste en transposones, pero la gran mayoría han acumulado mutaciones que destruyen su capacidad de transposición.

Triploide: célula u organismo que tiene tres copias del genoma (en humanos, 69 cromosomas). Normalmente es letal en animales, incluyendo humanos.

Trisomía: tres copias de un cromosoma, pero conservando dos del resto, es decir, 47 en total (ver, por ejemplo, *Figura 2.11*).

Upstream: en una cadena de ácidos nucleicos, en la dirección 5' (del sentido de la cadena en el gen).

Validez analítica de un test: el grado con el que se mide lo que se intenta analizar.

Valor predictivo positivo: del resultado de un test, la proporción de casos positivos en un test que realmente tienen la enfermedad que se busca (ver *Cuadro 11.1*)

Vector: secuencia de ADN en la cual la porción de ADN de interés puede estar ligada, permitiendo ser manipulada e introducida en las células. La mayoría de los vectores son plásmidos naturales o bacteriófagos alterados por ingeniería genética (ver *Cuadro 4.5*).

Vellosidades coriales: excrecencias de origen fetal en la superficie externa del corión, la parte más externa de las membranas fetales.

Índice alfabético

Las cifras seguidas de una *f* remiten a las ilustraciones, las que van acompañadas de una *t*, a tablas o recuadros, y las que preceden a una *g*, al glosario.

Aborto 4, 5, 27
  temprano y consanguinidad 9, 10
  temprano y traslocaciones 44
Aceptor del procesamiento 60
ACG1B 219
Ácido(s) ascórbico, biosíntesis 217t
  aspártico, estructura 70t
  glutámico, estructura 70t
  nucleicos, estructura 57, 58
  nucleicos, hibridación 84-90
Aciduria, alivio de los síntomas 387t
Acondrogénesis tipo 1B *véase* ACG1B
Acondroplasia 161t, 263
Acoplamiento dirigido 401g
Acrocéntrico 29, 401g
Actuación en trans 401g
Adenina 57
  estructura 69t
Adenoma pleomórfico de glándula salivar 302t
ADN, análisis e hibridación 85-89
  búsqueda de mutaciones 115-140
  cadenas antiparalelas 59t
  de cadena simple, propiedades 124
  desecho 76
  desnaturalización 84
  empaquetamiento 46f
  en células humanas 30
  estructura 56
  estudio 81-114
  hélice doble 57
  metilación 178 y sigs.
  mitocondrial 67f
  polimerasa 116
  principio de replicación 58f
  recombinante, creación 93f
  replicación 34
  secuenciación 116-120
ADNc 230, 401g
  fabricación 108, 109
ADNmt 20
  y LHON 152
Adopciones, estudios de 333
Alanina, estructura 70t
ALAS, enzima 224t
Alaska, esquimales de, enfermedades genéticas 257t
Alcaptonuria 203t
Aldosterona, biosíntesis 205f
Alelos 401g
  marcadores compartidos de hermanos 337f
Alimentación infantil 195
Alopecia androgénica 168t
Alteración en oxidación de ácidos grasos, alivio de los síntomas 387t
Aminoácidos, sustitución 149, 150
  tripletes de 62
Amniocentesis 369f
Amplificación 84, 91
  métodos 106t
  multiplex dependiente de ligación *véase* MLPA
  y cáncer 301
Anafase 35f, 401g
  I 36f
  II 36f
Análisis 384
  bioquímico 366
  cromosómico 366
  cromosómico, material 28t
  de células fetales 370
  de ligamiento 66
  de ligamiento de oligonucleótidos *véase* OLA
  de ligamiento no paramétrico 336, 401g
  de portadores 367
  predictivos 367
Androstenediona, biosíntesis 205f
Anemia de Franconi y judíos ashkenazi 267t
  falciforme 81, 82f, 152, 153f
  falciforme, correlación genotipo-fenotipo 163t
  falciforme e hibridación 85
  falciforme, técnica de estudio 126t
  falciforme, tratamiento 386
  falciforme y PCR 97, 98
  falciforme y secuencia específica 120
  falciforme y ventajas de la heterocigosis 257, 258f
Aneuploidía 46
  en célula no euploide 401g
Angiogénesis, estímulo y cáncer 296t
Anillamiento de cadenas de ADN 401g
Animales, enfermedades similares 230
Anomalías constitucionales 50-52
  cromosómicas 30
  cromosómicas desequilibradas 47, 48, 83, 84, 100, 101
  cromosómicas e identificación de genes 244

cromosómicas equilibradas 47
cromosómicas estructurales 30, 48f
cromosómicas, necesidad de detección 27
cromosómicas, nomenclatura 29t 30t
cromosómicas numéricas estructurales 46, 47
cromosómicas, técnica de estudio 126t
de cromosomas sexuales 32t
estructurales 46, 47
numéricas 46
Antecedentes familiares 6
Antepasados, número de 338f
Anticipación 110t, 112,401g
e identificación de genes 231
Anticuerpo anti-distrofina 183f
Antígenos de clase I 209
de clase II 209
Humanos Leucocitarios *véase* HLA
AOII 219
Aparato reproductor y fibrosis quística 3t
Apareamiento al azar y ecuación de Hardy-Weinberg 253
Apoliproteína E, variantes 344t
Apoptosis 295, 310, 401g
evitar 296t
Aracnodactilia 230
Árbol genealógico 6-13
genealógico, ambigüedad 16
genealógico, confección 6t
genealógico de inmunodeficiencia severa 183
genealógico de la DSH 239f
genealógico del síndrome QT largo 137f
genealógico y herencia dominante 15
genealógico y herencia recesiva 15
Arginina, estructura 70t
ARN, análisis 108109
de transferencia 57, 62
ribosomal 57
y cadena sentido 59t
y expresión génica 76
ARNm, toxicidad 112
y northern blotting 108
Array de expresión 401g
Array-CGH 89f, 90f, 101f
AS 33t, 174, 175f, 178, 185, 187f
causas 188, 189
e imprinting 192, 193t
Ashkenazi, judíos 259, 260t, 267t, 268t, 281-283
judíos, origen 268
judíos y cáncer de mama 312
Asociación(es) 401g
interpretación 340
problemas del estudio 350-352
y ligamiento 341t
Aspargina, estructura 70t
Aspartilglucosaminuria y efecto fundador 257t
Ataxia de Friedreich *véase* FRDA
espino-cerebelar *véase* SCA
pseudo-Friedreich, alivio de los síntomas 387t
Ataxia-telangiectasia 306t
Atelosteogénesis tipo II *véase* AOII
Atrofia dentatorubral palidoluisiana *véase* DRPLA
muscular espinal *véase* SMA
muscular espinobulbar *véase* SBMA
óptica hereditaria de Leber *véase* LOHN
ATRX 51t, 52t, 144
complejo de remodelación de la cromatina 71
AUG, codón de inicio 62
Autismo 358t, 359t
Autocigosidad, mapeado de 243f
Autosomas 29, 401g
Autosómicas dominantes, enfermedades 6, 7, 11, 12f, 14t
recesivas, enfermedades 6, 14t
Azar en poblaciones reproductivas pequeñas 255
Azatioprina 207t, 208

BAC 92t, 93t
Bandas cromosómicas, nomenclatura 31f
patrón 28
Bandas-B 29t
Bandas-G 28, 31f, 42f, 401g
estándar 27
Bandas-R 28
Barrer, hipótesis de 195
Bases, emparejamiento 57
Bayesiano, cálculo 365t, 366t
Beare-Stevenson girata 161t
Bebé(s) diseñados 390, 391
dismórfico 11, 30, 83, 100, 101
hipotónico 175f
nacido muerto *véase* SB
Beduinos, enfermedades genéticas 257t
Benzodiacepinas y porfirias 224t
BiDil, archivo 221
Biopsia de vellosidad corial 50, 367f-369
testicular 28
Bioquímico, análisis 367
Bisulfito, secuenciación con 181f
Blastocisto y células madre embrionarias 374f
Bonferroni, corrección de 403g
Bucle e inversión cromosómica 49
Butirilcolinesterasa 208
deficiencia y efecto fundador 257t

Cabeza, movimiento incontrolados 1, 2f
Cadena efectora 401g
molde 59t, 402g
roturas 166
sentido 59t
CAH 199, 200f, 203, 204, 206t, 219, 378
Cálculo bayesiano 365t, 366t
Canales iónicos y JLN 136t
Cáncer 159, 166, *véase también* Carcinoma
análisis de cambios citogenéticos 297t
célula fundadora 296t
de colon 264, 306t, 317-319
de colon como enfermedad multifactorial 321, 322
de colon, vía de desarrollo 320
de mama 264, 293, 294f, 306t, 311-314
de mama como enfermedad multifactorial 321, 322

de mama y judíos ashkenazi 267t
de ovario 19
de próstata 168t
de vejiga 301
desarrollo multipasos 319, 320
epigenética del 176, 320, 321
y genética 293-327
y penetrancia 17
y terapia génica 379
Candidato posicional 232, 402g
Carácter(es) cuantitativos 332, 402g
dicotómicos 332, 402g
dominante 15f
neutros, frecuencias génicas 256
penetrante 16
Carboxilasa, deficiencia, alivio de los síntomas 387t
Carcinoma *véase también* Cáncer
de colon humano HT29 297t
renal 324t
Cardiopatía congenita *véase* CHD
Cariograma 402g
Cariotipo 29t, 402g
análisis estándar 27
femenino normal 38f
Cascada de búsqueda 402g
Cataratas y distrofia miotónica 112f
β-Catenina, niveles 316f
Cebador 93, 94f, 402g
forward 94
reverse 94
sintético 94f
Célula(s) aneuploides 46
B 173, 174t
euploides 46
falciformes 82f
madre embrionarias 402g
madre embrionarias, terapias con 374f
natural killer *véase* Célula NK
NK 173, 174t
Centrómeros 29, 33, 75, 402g
tinción 28
CFTR, estructura del gen 71t
CGH 87, 88, 89f, 90f, 406g
aplicaciones 106t
Chaperonas 63
CHD 12f
Chips y detección de mutaciones 133, 134
Ciclo celular, punto de comprobación 307f, 410g
Cisteamina y tratamiento de la cistenosis 386f
Cisterna, estructura 70t
puentes disulfuro 63
Cistinosis, alivio de los síntomas 387t
tratamiento 385, 386f
Citocromo P450 204, 205f
Citosina 57
estructura 69t
y mutaciones 166
5-metil-Citosina 179f, 180f
desaminación 167, 190f
CIV 25
CK 102
Clon 21, 166
BAC 134
mutante en línea germinal 21, 22
Clonación 92t, 93t
de *E. coli*, aplicaciones 106t
posicional 402g
reproductiva 402g
terapéutica 375f, 402g
Clonaje posicional 231, 232
Codeína, transformación 207, 208
Código genético 61, 62, 147f
Codón 62
CAG 111
de glutamina 104, 105
de inicio 62
de parada 62, 402g
Coeficiente de consanguinidad 262
de endogamia 402g
de parentesco 262, 402g
Colágeno, biosíntesis 155t
II 154
VII, estructura del gen 71t
Colesterol, biosíntesis 205f
Colon, poliposis adenomatosa 294, 295f
glicoproteína-distrofina 152f
Complejo mayor de histocompatibilidad *véase* MHC
Comunicación interventricular *véase* CIV
Condensación 34
Congénitas, enfermedades 20
Congénito 402g
Consanguíneo, matrimonio y enfermedad recesiva 265
Consanguinidad 9, 10t
coeficiente de 262f, 402g
Consejo genético, definición 365
genético, riesgos 16, 17
genético y diagnóstico 383
genético y riesgo de recurrencia 364, 365
Consultante en el árbol genealógico 6t
Convención de París 28
Conversión(es) en un gen 402g
génicas y deficiencia de la 12-hidroxilasa 206t
Coproporfiria 225f
Corpúsculo polar 36f
Corrección de Bonferroni 350, 403g
Corticosterona, biosíntesis 205f
Cortisol, biosíntesis 205f
Cósmico 92t
CpG, cantidad de mutaciones 190, 191
dinucleótidos 179
Cráneo hair on end 115f
Creatinina quinasa *véase* CK
Cribado, aspectos económicos 289
criterios en el Reino Unido 285t
de adultos 273, 274
de estilo de vida 286t, 289
de recién nacidos 273, 287
en cascada 279

en cascada e hipercolesterolemia familiar 290t, 291t
en suero materno de la fetoproteína 272f
enfermedades diana 283, 284
prenatal 273, 287
proceso 274, 275
sujetos indicados 274, 282, 283
test de 411g
triple para el síndrome de Down 276f
utilidad 271-292
y enfermedad de Tay-Sachs 282t
y fibrosis quística 280f, 281t
y tests diagnósticos 272
Cromátidas 29, 403g
hermanas 30t, 35, 403g
Cromatina 29, 403g
enfermedad de 52t
Cromatografía líquida 403g
líquida desnaturalizante de alto rendimiento *véase* dHPLC
Cromosoma(s) 1 19
1 rotura 43
2q21 e intolerancia a la lactosa 218t
6, distribución de genes 74f
7 8, 77t
12 y leucemia 311f
12q13 154
15 188f
16p 51t
17 18t
21 101f
22 25
22, deleción 68
22, rotura 43
bacterianos artificiales *véase* BAC
condensación 34
de levaduras artificiales *véase* YAC
definición 45, 46
en anillo 48f
en división celular 34-38
estudio 25-54
estudio microscópico 27
homólogos 29t, 403g
Philadelphia 303t
pintado de 109, 110
roturas 30
roturas proximales 33t
roturas terminales 33t
segmentos ancestrales 337-339
sexuales, anomalías 32t
traslocación, técnica de estudio 126t
X, compensación de dosis 176, 177f
X e Y recombinación 177f
X frágil 112
X, inactivación 49, 191, 192
X, inactivación al azar 185f
Y, número de genes 19
Cromosómica, inestabilidad 296
Cromosómico, análisis 367
CTG, repeticiones 112f
Curva ROC 276
Cutáneos, problemas y profirias 224t
CYP3A4, enzima 221

ddNTP 403g
Debilidad muscular y pseudohipertrofia *véase* DMD
Dedos grandes 246t
Defectos del tubo neural *véase* NTD
Deficiencia de butirilcolinesterasa y efecto fundador 257t
múltiple de sulfatasas *véase* SUMF
Deformación, definición 84t
Degradación mediada por mutaciones terminadoras 226t
mediada sin sentido 149f, 403g
ruta de 201
Dehidroepiandrosterona, biosíntesis 205f
Deleción 29f, 47
15q11q13 186f
15q11q13 y AS 190t
15q11q33 y PWS 190t
22q11, correlación genotipo-fenotipo 163t
22q11 de banda 99
22q11, técnica de estudio 126t
análisis por FISH 186
de exones completas, detección 124, 125
de gen entero 143
de pocos nucleótidos 116
de un exón 147, 148
en cromosoma 22 68
en el gen de la distrofina 66f
gran, efectos 157t
intersticial 48f
terminal 48f
WBS 77t
y deficiencia de la 12-hidroxilasa 206t
11-Deoxicorticosterona, biosíntesis 205f
11-Deoxicortisol, biosíntesis 205f
Deoxinucleótidos, estructura 117f
Deriva genética 403g
Desequilibrio 403g
cromosómico, correlación genotipo-fenotipo 163t
de ligamiento 341t
test de transmisión 351t
Desiertos genéticos 69
Desnaturalización 84, 85f, 403g
Desoxirribosa 57
DHT 167
Diabetes 331t
alivio de los síntomas 387t
estudios de asociación 346, 347
formas monogénicas y complejas 347, 349
mellitus neonatal transitoria 193t
tipo 2 330, 345 y sigs.
y terapia génica 379
Diagnóstico, establecer 263, 264
por imagen 370, 371
prenatal, posibilidades 376, 377
y consejo genético 383
Dibujo y niños WBS 78t

Dideoxinucleótido(s) 403g
estructura 117f
marcaje fluorescente 117, 118f
Dihidrotestosterona *véase* DHT
Dimorfismo 68
Dinucleótido CpG 403g
Diploide 403g
Disautomía familiar y judíos ashkenazi 267t
Discromatosis simétrica hereditaria *véase* DSH
Dismórficos, bebé con caracteres 5f
Dismorfología 83
Disomía uniparental *véase* UPD
Displasia, definición 84t
distrófica *véase* DTD
espóndil-epifisaria *véase* SED
múltiple epifisaria 4 219
tanatofórica 161t
Disrupción, definición 84t
Distancias genéticas 232
Distonía de torsión 1 y judíos ashkenazi 267t
Distribución de Hardy-Weinberg 253t, 403g
Distrofia miotónica 1 *véase* DM1
miotónica 2 *véase* DM2
miotónica, anticipación 112f
miotónica y efecto fundador 257t
muscular 151, 152
muscular, correlación genotipo-fenotipo 163t
muscular de Duchenne 4f, 66, 102-106, 148, 181 182f
véase también DMD
muscular de Duchenne, localización cromosómica 245t
muscular de Duchenne, técnica de estudio 126t
muscular de Duchenne, tests 384
muscular de Duchenne y PCR 102-104
muscular de Martin 6
muscular ligada al X 10, 11f
Distrofina 151, 152f
gen de 66, 71t, 103
División celular, control genético 295
celular, cromosomas en 34-37
celular, preparación 34
DM1 111t
DM2 111t
DMD 102 y sigs., 388, 389, *véase también* Distrofia muscular de Duchenne
cribado neonatal 279
tasa de mutación 264
tratamientos 389f
Dominancia 159
Dominante 404g
ligada a X, herencia 14t, 18, 19
negativo 403g
Dominios, organización 74f
Donador del procesamiento 60
Dosificación, sensibilidad a 164, 165
Dosis sensible 404g
Dot blotting 86, 88, 404g
blotting, aplicaciones 106t
blotting reverso 404g
blotting y anemia falciforme 97f
Downstream 404g, 412g
secuencia 59t
Drosophila melanogaster, mapeo genético 233f
Drowning y QT largo 136f
DRPLA 111t
DSH 229f
identificación de genes 238-242
DTD 219
correlación genotipo-fenotipo 220f
transportadora de sulfato *véase* DTDST
y efecto fundador 257t
DTDST 219
Duplicación 47, 48f
de exones completos, detección 124, 125
de gen entero 143
de gen entero, efectos 157t
de un exón 147, 148

*Eco*RI 235f
Edad materna y síndrome de Down 41t
materna y síndrome de Turner 42
y cáncer 294
EEG, cambios 175
Efecto fundador 256f, 257t, 404g
Elastina 63t
Electrocardiograma QT largo 136f
Electroferograma de secuenciador de ADN 119f
Electroforesis, gel 91t
Emigración y frecuencias génicas 255
Empaquetamiento del ADN 46f
Emparejamiento al azar 404g
Enanismo hipofisario, alivio de los síntomas 387t
ENCODE, proyecto 73, 409g
Endogamia, coeficiente 402g
y enfermedad decisiva 265t
Endonucleasas de restricción 90t, 404g
Enfermedad(es) *véase también* Síndrome
complejas, estudio genético 333 y sigs.
comunes, hipótesis de la variante común 404g
comunes, susceptibilidad genética 329-362
cromosómicas, riesgo de recurrencia 364
de Alzheimer 329, 330, 341, 342f y sigs.
de Alzheimer y terapia génica 379
de Canavan y judíos ashkenazi 267t
de comienzo tardío, tratamiento 379
de depósito liposomal 404g
de Fabry, alivio de los síntomas 387t
de Gaucher, alivio de los síntomas 387t
de Gaucher y judíos ashkenazi 267t
de glucoproteína carbohidrato-deficiente tipo Ib, tratamiento 385
de Huntington 65, 104f, 110t, 111t, 150, 264
de Huntington, correlación genotipo-fenotipo 163t
de Huntington, técnica de estudio 126t
de Huntington, test de exclusión fetal 245f
de Huntington, test predictivo 368t
de Huntington y PCR 104f
de Huntington y terapia génica 379, 380
de la cromatina 52t, 404g

de Machado-Joseph *véase* SCA3
de Niemann-Pick y judíos ashkenazi 267t
de poliglutaminas 112
de Pompe, alivio de los síntomas 387t
de Refsum, alivio de los síntomas 387t
de Tay-Sachs 251, 252f y sigs., 259, 260t, 281-283
de Tay-Sachs y judíos ashkenazi 267t
de von Hippel-Lindau 306t, 324t, 325t
de Werdnig-Hoffmann *véase* SMA
del depósito de glicógeno, alivio de los síntomas 387t
del jarabe de arce, alivio de los síntomas 387t
dominante grave ligada al X 264
dominante letal 263
frecuencia 251 y sigs.
frecuencia y efecto fundador 258, 259
frecuencia y heterocigosis 258, 259
genéticas cribadas en Estados Unidos 288t
genéticas, soluciones 263-392
genéticas, supresión 265, 266
huérfanas 134
mendelianas, identificación de genes 229-250
mendelianas, riesgo de recurrencia 364
patología molecular 150 y sigs.
recesiva y matrimonio consanguíneo 265
recesivas ligadas al X 263
riesgo de recurrencia 335t
técnicas de estudio 126-131
y enzima, correspondencia 218
Ensayo de ligamiento con oligonucleótidos 122f
Enzima(s) CPU 130
CYP 207
de restricción 120, 404g
*Hpa*II 180, 184, 185
*Msp*I 180
*Rsa*I 130
transportadores de sulfato 219
y enfermedad, correspondencia 218
Epigenética 173-198, 404g
del cáncer 320, 321
Epigenéticos transgeneracionales, efectos 195, 196
Epilepsia miotónica progresiva *véase* PME
Epimutación 404g
Epitoma 404g
Equilibrado 404g
Eritrocitos falciformes 81
Errores congénitos del metabolismo, historia 203t
de ploidías 46
innatos del metabolismo 201 y sigs.
Espermatogénesis 36f
y selección natural 264
Esquimales, enfermedades genéticas 257t
Estados Unidos, cribado genético 187f, 288t
Estatura pequeña 26
Estenosis supravalvular aórtica (ESVA) 77t
Estilo de vida y análisis genético 286t
Estrógenos y síndrome de Turner 41f
Estudios de ligamiento 336, 337
familiares 333
Ética, consideraciones 376
y cribado 284 y sigs.
Eucromatina 29t, 71, 404g
Euploide 404g
Exclusión fetal, test de 412g
Exón(es) 58, 404g
14b, gráfico de secuenciación 128f
14b y fibrosis quística 127f
3 de *TGFRB2* 319f
3 y fibrosis quística 127f
completos, detección 124, 125
de genes *BRCA* 312f
del gen de la distrofina 103f, 104, 148t
deleción entera 147, 148
duplicación entera 147, 149
shuffling 158
Expresión variable 17, 18t
Extremo 3' 59t
5' 59t

Factor(es) de crecimiento de los fibroblastos, mutaciones 161t
de susceptibilidad, detección por asociación 337 y sigs.
de transcripción 71, 405g
modificante de sulfatasas *véase* SUMF
Familiar(es) 405g
creencias 6t
enfermedades 20
estudios 333
FAP 315-317
Fármaco *véase* Medicamentos
Farmacogenética 204 y sigs., 220-222, 405g
Farmacogenómica 405g
FECH, mutación 224t
Fenilalanina, catabolismo 202f
estructura 70t
hidroxilasa 220f, 278
hidroxilasa, estructura del gen 71t
y feto 278f
Fenilcetona, producción 202f
Fenilcetonuria 272f, 276-278, *véase también* PKU
alivio de los síntomas 387t
tratamiento 377, 378
Fenocopia 405g
Fenotipo 405g
comprensión 160
predicción 164
Fenotipo-genotipo, correlación 219, 220f
Feocromocitoma 324t
Fetoproteína, test de cribado 272f
Fibrillina 63t, 64f
Fibroblastos, factor de crecimiento, mutaciones 161t
Fibrosis quística 2f, 3, 6, 8f, 21, 65, 151
quística, correlación genotipo-fenotipo 163t
quística, cribado 279-281
quística, técnica de estudio 126t
quística y ecuación de Hardy-Weinberg 254
quística y gen *CFTR* 146
Finlandeses, enfermedades genéticas 257t, 268t
y diabetes 346t

FISH 86, 87
aplicaciones 106t
de interfase 87
de interfase y trisomía 21 100
de metafase 22q11 99f
y pintado de proteínas 109, 110
Fluorouracilo 207t
Fórmula de Hardy-Weinberg 252
Fosfato, retención en los riñones 19
Fracción atribuible a la población 410g
Fragmentos de Okazaki 298, 405g
Frameshift 223
Franceses caucasianos y diabetes 346t
FRAXA 111t
FRAXE 111t
FRDA 111t, 112
Frecuencias alélicas 252
génicas 252 y sigs., 405g
génicas, cambio con la generación 254, 255
génicas, factores determinantes 255, 256
Función, ganancias 157-159
pérdidas 157-159
Fusión TEL-AML1 311f

β-Galactosidasa 144
Gametos, producción 35
GC-MS 203t
Gel de electroforesis 91t
Gemelos, estudios de 333, 335
Gen(es)
26 de la conexina, mutación 148f
ABL 300t, 303f
APC 315
APC alelo p.lle1307Lys 319f
APC, estructuras inusuales 317t
APP y enfermedad de Alzheimer 342t
AR, mutación 168t
ATRX 51t, 246t
aumento de 372
BCR 303f
BRAF 320
BRCA y cribado 274
BRCA1 311, 312f y sigs.
BRCA2 19, 311, 312f y sigs.
cambio de secuencia, análisis 122-125
CDKN2A 309f
CFTR 8, 63, 65
CFTR, análisis de exones 128f
CFTR, cribado 279, 280
CFTR, mutaciones 158t
CFTR, mutaciones, técnica de estudio 126t, 127f
CFTR, splicing 145
COL2A1 154
como unidad funcional de ADN 57, 230
compartidos y parentesco 261t
CYP polimorfismos y metabolismo 208f
CYP21 200, 206t, 210, 211t
CYP2C9 222
de canales iónicos 136t, 137t
de enfermedades mendelianas, identificación 229-250
de inmunoglobulinas, reordenamiento 223t
de la β-globina 97, 129, 130, 146, 152, 153f, 231f
de la distrofina 103, 124
de la distrofina, tamaño de exones 148t
de la DSH, árbol genealógico 239f
de la elastina 77t
de la fibrillina, exones 122
de reparación de apareamiento erróneo 318t
de RSTS, identificación 246t
del canal del cloro *véase* Gen *CFTR*
del cromosoma Y 19
del MHC 209
del PWS 189f
del receptor de células T 223
del síndrome de Angelman 189f
DMD 66
DSRAD 241, 242
encendido y apagado 70-72
entero, deleción 143
entero, duplicación 143
ERBB2 300t
estructura 58
exógeno, método de inserción 372f
F8, mutación 98f
FBN1 63t
FES 300t
FGFR, correlación genotipo-fenotipo 161t
FMS 300t
función global 142
funcionamiento 55-80
GJB2 243
GJB2, mutación 167
HD 65, 104
HEXA 259
HFE 224t
HNPCC, mutaciones 320
HRAS 300t
identificación 230
IGF2 195
IGF2, imprinting 193
IL2RG, mutación 216f
interrupción 49, 143, 144
KCNE1 137t
KCNQ1 137t
KRAS 300t
MECP2 19
MLL 301
modificador 405g
MYB 300t
MYC 300t
NF1 18t
no funcional 49
número de intrones 71t
número de proteínas codificadas 72, 73
OTOF 244
penetrante 16
promotores diversos 73
PSEN y enfermedad de Alzheimer 342t

PTPRJ 322
quimérico 158
quimérico BCR-ABL 303t
RAS 301
receptor de andrógenos patología de las variantes 167t, 168t
reparación 372
SCN5A, mutación 137t
silenciado 372
SIS 300t
SMN2 146
SRC 300t
SRD5A2 167
SRY 167t
STK15 322
suplementación 372
supresores de tumores 297, 303, 405g
supresores de tumores, función normal 307-309
supresores de tumores mutados 306t
supresores de tumores y puntos de control 307
tamaño 69
TP53 308
TUPLE1 99
UBE3A 189
VKORC1 221, 222
XIST 176
Generaciones posteriores, agravamiento de la enfermedad 110t
Género y enfermedades genéticas 15
Genitales ambiguos 199, 120f, 210, 211
Genoma 405g
completo, estudios de asociación 340
completo, estudios de ligamiento 343t
funciones 75, 76
humano, pares de bases 58
mitocondrial 67f
Genómica funcional 405g
Genómico 405g
Genotipado de alto rendimiento 135
Genotipo-fenotipo, correlación 160, 161t, 162, 163, 219, 220f
Gentamicina y fibrosis quística 386
Gitanos búlgaros, enfermedades genéticas 257t
Glándulas sudoríparas y fibrosis quística 3t
Gleevec 220
Glicina, estructura 70t
Glioma 18t
α-Globina deficiente 51t
β-Globina, mutaciones en el gen 153f, 154f
Globina, genes de la 231t
Glutamina, estructura 70t
Grecochipriotas y cribado 289
y talasemia 129
Guanina 57
estructura 69t
GULO, enzima, carencia de 217t

Hamartoma en el iris 18t
Haploide 405g
Haplo-insuficiencia 159f, 405g
Haplotipo 405g
de DSH 241f
HapMap 352, 353f, 354, 409g
Hélice doble 57
Hemangioblastoma CNS 324t
de retina 324t
Hematomas extensos 200
y hemofilia 82
Hemo, grupo, alteraciones de biosíntesis 224t
grupo, biosíntesis 225f
Hemocromatosis 224t
alivio de los síntomas 387t
Hemofilia 82, 83
A, alivio de los síntomas 387t
A, correlación genotipo-fenotipo 163t
efectos 82f
técnica de estudio 126t
y PCR 98
Hemoglobina E 146
Herceptina 220
Heredabilidad, concepto 332, 333, 405g
Hermano(s) 10
análisis de 336, 337
sano portador, riesgo 260t
y factor de susceptibilidad 350t
Heterocigosidad, pérdida de 305
Heterocigosis, ventajas 257, 258f
Heterocigotos 405g
con manifestación 183
funcionalidad 159f
Heterocromatina 29t, 71, 76f, 405g
Heterodúplex 123f, 405g
propiedades 122, 123
Heterogeneidad alélica 405g
de un locus 405g, 406g
Heteroplasmia 20, 406g
Hexosaminidasa A, mutaciones 260t
Hibridación 84, 85f
competitiva 88
de ácidos nucleicos 84-90
fluorescente 406g
genómica comparativa *véase* CGH
in situ fluorescente *véase* FISH
métodos de aplicaciones 106t
Hibridar 406g
Hidralacina 207t
3-β-Hidroxiesteroide deshidrogesa 205f
21-Hidroxilasa, análisis mutacional 211t
consecuencias de la deficiencia 206t, 207t
genotipo 212f
17-Hidroxipregnenolona, biosíntesis 205f
17-Hidroxiprogesterona, biosíntesis 205f
Hierro, acumulación hepática 115f
Hígado, actividad ALAS y porfirias 224t
y fibrosis quística 3t
y metabolismo de fármacos 221
Hiperactividad 276
Hipercolesterolemia, alivio de los síntomas 387t
y cribado 290t, 291t
Hiperpigmentación 229f
Hiperplasia adrenal congénita *véase* CAH

Hipertermia maligna *véase* MH
Hipofosfatemia ligada al X 19
Hipótesis Barker 195
  de la variante común 354
  de los dos hits 304 y sigs.
  de un gen un enzima 56, 406g
Hipoxia y metabolismo celular 325f
Histidina, estructura 70t
Histología muscular 10
Histonas 179
Historia(s) clínicas 1-5
  familiar 1-24
HLA 209
  árbol genealógico 214f
  clase 1, estructura del gen 71t
  frecuencias alélicas 215t
Hombre, mapeo genético, problemas 234-236
  XYY 32t
Homeodominio 74f
Homocistinuria, alivio de los síntomas 387t
Homodúplex 123f
Hormonas esteroideas, rutas sintéticas 205f
  mineralocorticoides, biosíntesis 205f
Huntingtina 150
Huntington, enfermedad 1, 2f, 6-8, 15f, 20

IGH 301
Imitanib 220
Imprinting 178, 189
  en 15q11q13 186, 187f
  enfermedades relacionadas 192
  error y AS 190t
Imprinting, error y PWS 190t
  propósitos 192, 193
Inactivación de X 176, 177f, 406g
  de X, consecuencias en mujeres 191, 192
Indios pima y diabetes 346t
Inestabilidad cromosómica 296, 406g
  de microsatélites 296, 406g
Infertilidad masculina 19, 20
Inmunodeficiencia combinada ligada al X *véase* X-SCID
  severa ligada al X 183f-185
Inmunogenética 199 y sigs., 208 y sigs., 222, 223
Inmunoglobulinas 223
Inserción de pocos nucleótidos 116
Insulina, estructura del gen 71t
Interferón A6, estructura del gen 71t
Interpretación del árbol genealógico, riesgos 16, 17
Interrupción de gen 143, 144
Intestino abultado 2
  y fibrosis quística 3t
Intolerancia a la lactosa 218t
Intrón(es) 58, 406g
  cambios, efectos 157t
  comienzo GU 60
  fin AG 60
Inversión 29t, 47, 48f, 406g
  efectos 157t
  F8 98, 99f

Iris, harmatomas 18t
IRT, medición 279, 280f, 281t
Islas CpG 190, 191, 406g
Isoformas de splicing 406g
Isoleucina, estructura 70t
Isoniacida 207t

JLN 136t
Judíos ashkenazi 251, 259, 260t, 281-283
  ashkenazi y cáncer de mama 312
  enfermedades genéticas 267t, 268t

Kilobase 58t
Knock-out de DSRAD 242
Kozak, secuencia de 62

Laboratorios farmacéuticos 204, 207
Lactosa, intolerancia a 218t
LAL 200, 213, 314, 378, 379
Lectura, cambio de marco 223
  patrón de 62t
Lenguaje, desarrollo 78t
Lepore 406g
Leucemia 301
  aguda linfoblástica *véase* LAL
  aguda megacarioblástica 302t
  eritroblástica aviar 300t
  linfoblástica aguda 200
  linfocítica crónica 302t
  mieloide crónica *véase* LMC
  murina Abelson 300t
  murina Friend 300t
  promielocítica aguda 302t
  y terapia génica 379
Leucina, estructura 70t
LHON 12, 13f, 131, 132, 152
  correlación genotipo-fenotipo 163t
  técnicas de estudio 126t
Librería 92t, 406g
  de ADNc 230
Ligada(s) al X, enfermedades 18, 19
  al Y, herencia 14t, 19
Ligamiento 406g
  análisis en DSH 240t
  con oligonucleótidos 122f
  en desequilibrio 406g
  protocolo de búsqueda 236, 237
  test estadístico 237
  y asociación 341t
Limitadas al sexo 406g
  al sexo, enfermedades 19
LINE, elementos 75
Línea(s) celulares distintas 21
  celulares y células madre 374f
  germinal 406g
  germinal y mutación 21
  germinal y terapia génica 373f
Linfocitos de sangre periférica 28t
  elevados 200

recuento bajo 173
T 173, 174f
Linfoma de Burkitt 302f
folicular 302t
linfoblástico 302t
Lionización 176, 177, 407g
Lipofuscinosis y efecto fundador 257t
Liposarcoma 302t
Liposomas 371
Líquido amniótico 407g
amniótico, recolección 28
Lisina, estructura 70t
LLA 302t
LMA 302t
sin maduración 302t
LMC 302t, 303t
LMMA 302t
Locomoción, problemas 174, 175
Locus 407g
de rasgos cualitativos *véase* QTL
de regiones de control 69, 410g
distancia entre 232
VHL 324t
Lod score 237, 407g
LOHN 5f, 20
mutaciones 67f
Louisiana, habitantes, enfermedades genéticas 257t
Lumpers 162

Malaria y talasemia 51t
Malformación, definición 84t
Mandíbula pequeña 142f
Manifestación heterocigótica 407g
Manos, aspecto osteoporótico en talasemia 115f
frotamiento 194t
y dismorfología 83
Mapeo de autocigosidad 243f, 260, 407g
genético 232 y sigs.
Marcador de ligamiento y seguimiento de un gen 245, 246
Marcador(es) DIS2777 241
genéticos, uso 234 y sigs.
Marcaje fluorescente de dideoxinucleótidos 117, 118f
Materna, edad y síndrome de Down 41t
edad y síndrome de Turner 42
Matrilineal, herencia 20
Medicamentos *véase también* Fármacos
efectos secundarios 204, 207t
genotipo-específicos 221
metabolismo hepático 221
transformación mediante P450 207
y genes 199-227
Megabase 58t
Megacolon dominante en ratones 230
Meiosis 35-37f
definición 34
errores 50
etapas 36f, 37
femenina 34
informativa 407g
masculina, investigación 28
número necesario para ligamiento significativo 236
Melanoma familiar 306t
Mendelianos, caracteres 331
caracteres, penetrancia 17f
6-Mercaptopurina 213
Metaanálisis 407g
Metabolismo, errores innatos 201 y sigs.
y genes 199-227
Metabolizador importante 207, 208f
intermedio 207, 208f
lento 207, 208f
medio 207, 208f
ultrarrápido 207, 208f
Metacéntrico 29f, 407g
Metafase 35f, 407g
I 36f
II 36f
Metilación 407g
CpG 179 179f
del ADN 178 y sigs.
enzimas de restricción sensibles a 180
Metilasa de mantenimiento 180f
Metionina, estructura 70t
Método de parejas afectas 407g
Mexicanos y diabetes 346t
M-FISH 110
MH 221
MHC 209
árbol genealógico 214
locus humano 210f
Microarray 88, 407g
y detección de mutaciones 133, 134
Microcefalia 83
Microdeleción(es) 33t, 407g
22q11 25
cromosómicas e hibridación 85, 86
Microduplicación cromosómica, correlación genotipo-fenotipo 163t
Microfibrillas, formación 63t, 64t
Microsatélites 234, 235f, 318, 407g
inestabilidad 296
Mieloblastosis aviar 300t
Mineralocorticoides, hormonas, biosíntesis 205f
Miopía 141, 142f, 154, 155
Mitocondrial, ADN, mutación 152
herencia 13f, 14t, 20
Mitosis 35f
deficiente 21
definición 34
MLPA 124, 125f, 409g
MMR 318
Mola hidatiforme 178f, 193
Monosomía 22 29f, 43f, 407g
Mortinato *véase* SB

Mosaicismo 21f, 22, 50
cromosómico 50
Mosaico, definición 21, 408g
del X 177f
germinal 408g
tetrasomía 12p 50
Mosca del vinagre *véase Drosophila melanogaster*
Movimientos incontrolados 1, 2f
MSAFP, test 273r
Muerte súbita y QT largo 136t
Mujer 47,XXX 32t
como mosaico del X 177f
portadora obligatoria 11f
Multifactorial(es) 408g
caracteres, penetrancia 17f
Musculares degenerativas, enfermedades 10
Mutación(es) a gran escala 107
BRCA, sistema de evaluar la probabilidad 313f
BRCA1 294f
búsqueda en genes candidatos 237, 238
c.316>106C>G 154f
c.316-106C>G 131f
c.92+1G>A 154
c.93-21G>A 153, 154
de cambio de patrón 408g
de cambio de sentido 150
de *CFRT* y fibrosis quística 281t
de ganancia de función 158, 160, 162
de 21-hidroxilasa 206t, 211t
de la fibrosis quística 65
de *LHON* 67f, 131, 132
de pérdida de función 167t
de pérdida de sentido 143t, 157t, 158t
de talasemia en grecochipriotas 130t
detección 115-140
dominantes negativas 159
downstream 160
efectos 141-172
en el splicing, efectos 157t
en genes supresores de tumores 306t
familiar, detección 120
frameshift 279
G11778A 131, 132f
G3460A 131, 133f
identificación, técnica de estudio 126t
mecanismo de aparición 166, 167
mitocondrial, técnica de estudio 126t
momento 21
negativas dominantes 156
nomenclatura 129t
nuevas 18t, 21
nuevas y frecuencias génicas 255
p.F508des 127
p.GLn39X 153f
p.Gln39X, identificación 130f
puntuales 107
puntuales e hibridación 85
puntuales y AS 190t
puntuales y cáncer 301
puntuales y PWS 190t
reguladoras 145
sin sentido 143t, 149, 157t, 408g
sin sentido, efectos 157t
somáticas 166, 408g
T14484C 131
tasa celular 296
terminadoras, degradación mediada por 226t
y errores de traducción 147-149
y splicing del tránscrito primario 145, 146
Mutagénesis con rayos X 203t

NCHPEG 357t
Neoplasia múltiple endocrina 306t
Neurofibromas dérmicos 18t
Neurofibromatosis 306t
tipo 1 *véase* NF1
Neuronas, muerte por toxicidad 111, 112
Neuropatía recesiva ligada al X 12, 13f
hereditaria motora y sensorial y efecto fundador 257t
óptica hereditaria de Leber *véase* LHON
NF1 17, 18t
No-disyunción 40f
Nódulo de Lisch 18t
No-penetrancia 16
Northern blot 108, 408g
NTD 273t
Nuca, piel redundante 26
Nucleósidos 408g
Nucleosoma 408g
Nucleótidos 57, 408g
expansión de repetición 110t, 11t

OLA 121
Oligonucleótidos 408g
ensayo de ligamiento 122f
Oncogén(es) 297, 299, 300, 408g
ABL 303t
activación 300, 301
expresión y reordenamiento génico 301
función 300, 301
HRAS 301
MYC 301, 315
virales 300t
Osteogénesis imperfecta, alivio de los síntomas 387t
Otoferlina, gen 244
Ovogénesis 36f, 37
Óvulos donantes y síndrome de Turner 41f

Pacientes, estudio mediante PCR 96-106
técnicas de estudio 126-131
Padres levemente afectados 110t
Paladar hendido 142f
Páncreas y fibrosis quística 3t
Par de bases, número en el genoma humano 58
Parentesco, cálculos de los efectos 261t
coeficiente de 262, 402g
Patrón de lectura 62t
de lectura, cambios 147, 157t

PCR 86, 91, 93-96, 107
aplicaciones 106t
avance 96t
cuantitativa 107, 108, 124
e imprinting 186
e inmunodeficiencia severa 184
en tiempo real 408g
enfermedades estudiadas 102-106
específica de alelo 121f
especificidad 95t
limitaciones 94
mutación no detectada con 116
principio 95f
test multiplex específico de alelo 12tf
y genitales ambiguos 211, 212t
Pecas axilares 18t
Penetrancia 16, 408g
de la herencia mitocondrial 20
espectro 17f
incompleta 17
reducida, árbol genealógico 16f
Péptidos señal 408g
Pérdida de heterocigosidad 305, 408g
Peso, ganar poco 2
Piel redundante en el cuello 26
Pies edematosos 25
Pirosecuenciación 120
PKU, correlación genotipo-fenotipo 220f
y cribado 275, 289
y descendencia 266t
Plásmidos 92t
Pleiotrópico 408g
Pliegue palmar único 26
PME 111t
Población de riesgo atribuible 283, 284t
Poligenes 408g
Poligénica, teoría 332, 333
Poligénico(s) 408g
caracteres 331
Poliglutaminas expandidas, toxicidad 111
Polimerasa, reacción en cadena *véase* PCR
Polimorfismo(s) 409g
de ADN y disomía uniparental 186, 187
de tamaño de fragmento de restricción *véase* RFLP
de un solo nucleótido 234, 235
genéticos y estilo de vida 286t
Poliposis adenomatosa 294, 295f, 306t
Pool génico 252, 409g
Porfiria 224-226t
cutánea tarda 224t, 225f
eritropoyética 224t, 225f
hepatoeritropoyética 225f
intermitente aguda 225f
variegata 225f
y metabolismo hepático 224t
Portador(es) análisis de 367
cribado de 274
obligatorio 409g
riesgo de DMD 384f
riesgos y ecuación de Hardy-Weinberg 254
de distrofia muscular de Duchenne 102 y sigs.
de traslocación X 191, 192
Portorriqueños, enfermedades genéticas 257t
PPSH 167t
Predictivo, análisis 367
Pregnenolona, biosíntesis 205f
Premutación 110t, 409g
Primer véase Cebador
Primos 10t, 409t
hermanos 10t
segundos 10t
Probabilidad inicial 409g
previa 365t
Procesamiento *véase* Splicing
Producto final, ausencia 201
Profase 35f, 409g
I 35
II 36f
17-hidroxi-Progesterona, niveles 200
Progesterona, biosíntesis 205f
Prolina, estructura 70t
hidroxilación 63
Prometafase 409g
Promotor 69, 409g
cambios en 144, 157t
Proteína(s) ACP 315, 316f
ATM 309
ATRX 51t
CDKL5 194t
de control del ciclo celular 309f
estructura 70t
estudio 109
FAS 310
FGFR3 264
HER2 220
MAGP-1 63t
MeCP2 194t
modificación postraduccional 62, 63
mutantes, toxicidad 150
plegamiento 62, 63
producto e identificación de genes 231t
RB 308
síntesis 61
SW12/SNF 51t
TGFBR2 319
Proteoma 409g
humano 74
Protooncogén 300, 409g
Protoporfiria eritropoyética 224t
Proyecto ENCODE 73, 409g
Genoma Humano 73t, 74t, 230
HapMap 352, 353f, 354, 409g
Pseudogenes 76, 410g
Pseudohipotiroidismo 193t
Ptosis y distrofia muscular 112f
Pulmón y fibrosis quística 3t
Punto de comprobación del ciclo celular 410g
de control G1-S 308t

PWS 33t, 175f, 178, 185f-188f
causas 188, 189f
e imprinting 192, 193t
y PCR 186

QF- PCR 108
QTL 332
Québec, habitantes, enfermedades genéticas 257t
Quimera 410g

Rabdomiosarcoma alveolar 302t
Radiación y mutaciones 166
Rastreo genético 410g
RB 304 y sigs.
mecanismos 305f
Recesivas ligadas al X, enfermedades 6, 14t
Recesividad 159
Recesivo 410g
Recklinghausen, enfermedad de von *véase* NF1
Recombinación 232f
entre repeticiones desemparejadas 77f
probabilidad 232
punto de 36, 37
Recombinantes 410g
reconocimiento 235f
Región no traducida de ARNm, cambios, efectos 157t
pseudoautosómica 177, 410g
Regulación génica 75
Reino Unido, cribado genético 285t
Reordenamientos cromosómicos y cáncer 301
Reparación de apareamiento erróneo 318, 410g
de genes 372
del ADN 166
Repetición(es) $(CAG)_n$ 168t
en tándem 234, 410g
Replicación 30, 34, 56f
y mutaciones 166, 167
Rescate de trisomía 189f, 410g
Resfriado 2
Retina y enfermedad de Tay-Sachs 252f
Retinoblastoma *véase* RB
Retraso mental 30
mental y talasemia 51t
Retrovirus 299f
de transformación aguda 410g
RFLP 235, 410g
Ribonucleótido(s), estructura 117f
Ribosa 57
Ribosomas 61
Riesgo(s) atribuible 283, 284t, 410g
empíricos 410g, 411g
genético y seguimiento de un gen 244f
relativo 410g
ROC, curva 276
Rotura de cadena 166
RSTS 244, 246t, 247t

RT- PCR 109, 122, 411g
Rubéola 9, 20
Ruta de Sewall Wright 262
metabólica simple, bloqueo 201f

Sangrado excesivo 207t
Sangre, muestra, diagrama de flujo 27f
Sarcoma de pollo Rous 300t
de rata Harvey 300t
de ratón Kirsten 300t
de virus felino 300t
sinovial 302t
SB 12f
SBMA 111t, 112, 168t
SCA1 111t
SCA2 111t
SCA3 111t
SCA6 111t
SCA7 111t
SCA8 111t
SCA10 111t
SCA12 111t
SCA17 111t
SCIDX1 214f-216
Screening prenatal 27
Secuencia(s) 3' no traducida 411g
5' no traducida 411g
amplificación 84
codificante 62
consenso 62, 411g
conservadas 75, 411g
conservadas en especies 74t
detección de cambios específicos 120-122
efectos de los cambios 142 y sigs.
en tándem 34
malformativa, definición 84t
reguladoras, cambios en 145, 157t
SINE 75
Secuenciación con bisulfito 181f, 411g
de genoma completo, nuevas tecnologías 135
de Sanger 117, 119t
de un gen 122
del ADN 116-120
etapas 116
manual 117, 119t
Secuenciador 118f
SED 156
Sefardíes, judíos, origen 268
Segmento(s) ancestrales compartidos 339
Segregación de cromosomas traslocados 45f
Selección natural y cáncer 295
natural y frecuencias génicas 255
natural y tipo de herencia 263f
Senescencia y cáncer 297
Sensibilidad de un test 411g
Señal anticrecimiento y cáncer 296t
Serina, estructura 70t
Sesgo de recogida 411g
Sexo, finalidad 36

Signo del árbol genealógico 6t
Silenciado de genes 372
Síndrome *véase también* Enfermedad
de Angelman *véase* AS
de Apert 161t
de Bardet-Biel y efecto fundador 257t
de Beckwith-Wiedemann e imprinting 193t
de Bloom y judíos ashkenazi 267t
de Brugada 137t
de Crouzon 161t
de Di George-VCFS 33t, 38, 39
de Down 26, 32t, 47, 68, 100, *véase también* Trisomía 21
de Down, correlación genotipo-fenotipo 163t
de Down, cribado prenatal 275, 276f
de Down, mosaicismo 50
de Down, técnica de estudio 126t
de Down, tests adecuados 277t
de Down y cariotipo 38
de Down y edad de la madre 41t
de Edwards 32t
de Gorlin 306t
de Hermansky-Pudlak y efecto fundador 257t
de Hurler 201
de Jervell y Lange-Nielsen *véase* JLN
de Ki-Fraumeni 306t
de Klinefelter 32t
de la X frágil 110t
de lipoproteína carbohidrato deficiente 1b, alivio de los síntomas 387t
de Marfan 55, 56f, 63t-65, 230
de Marfan, correlación genotipo-fenotipo 163t
de Marfan, técnica de estudio 126t
de Muenke 161t
de Pallister-Killian 50
de Patau 32t
de Prader-Willi *véase* PWS
de Reifenstein 167t
de Rett 19, 194t
de Romano-Ward 136t
de Rubinstein-Taybi *véase* RSTS
de Silver-Russell e imprinting 193t
de Smith-Lemli-Opitz, alivio de los síntomas 387t
de Smith-Magenis 33t
de Sotos, localización cromosómica 245t
de Stickler 141, 142f, 154, 155
de Stickler, correlación genotipo-fenotipo 163t
de Turner 26f, 32t, 41, 68, 182, 183
de Turner, cariotipo 41f
de Turner, correlación genotipo-fenotipo 163t
de Turner, técnica de estudio 126t
de Turner y PCR 102
de Usher y efecto fundador 257t
de Waardenburg tipo I, localización cromosómica 245t
de Waardenburg tipo IV 230
de Williams-Beuren 33t, 77t, 78t, 247t
de Williams-Beuren, localización cromosómica 245t
de Wolf-Hirschhorn 33t
del cri-du-chat 33t
familiar 162
malformativo, definición 84t
metabólico 195
metabólico, definición de la OMS 331t
por anomalías numéricas 32t, 33t
por microdeleción 33t
QT largo 136t, 137t, 159
SINE, secuencias 75
Single Strand Conformation Polymorphism *véase* SSCP
Síntomas, métodos para aliviar 387t
Sistema inmunitario y genes 199-227
legal 376
nervioso central, tumores 18t
Sitio A X frágil *véase* FRAXA
de corte y empalme 60
de splicing, eliminación 145, 146
de splicing, modificación 145, 146
E X frágil *véase* FRAXE
frágil 411g
SKY 110
SMA 146
tratamiento 386
SNPs 120
Sonda 411g
de detección de mutaciones 134
de hibridación 84, 86
de oligonucleótidos de un solo alelo 120
del cromosoma 12 101f
Soplo cardíaco 25
Sordera(s) 3f
autosómica recesiva 9f, 10, 66
congénita 260-262
congénita, identificación de genes 242-244
congénitas, factores ambientales 9
correlación genotipo-fenotipo 163t
técnica de estudio 126t
Southern blotting 86f, 107, 108, 411g
blotting, aplicaciones 106t
blotting, mutación no detectada con 116
blotting, principios 87t
blotting y hemofilia 98, 99f
blotting y repeticiones CTG 112f
Splicing 60
alternativo 72f, 409g, 409g
balance de isoformas 146
eliminación de sitio 145, 146
mutación en efectos 157t
sitio nuevo 146
Splitters 162
SSCP y ADN de cadena simple 124
y gen *CFTR* 128f
Stem cell 402g
Stillbirth *véase* SB
Sub-bandas 28
Submetacéntrico, cromosoma 30t, 411g
Succinilcolina 207t
Sudor, test del 8
Sulfatasa y modificación post-traduccional 217f
SUMF 217f

Susceptibilidad, factores y predicciones 354, 355
poligénica 334t, 335t
Sustituciones de aminoácidos 149, 150
sinónimas 150
sinónimas, efectos 157t
Sustrato, concentración y ruta de degradación bloqueada 201
Suxametonio 208

Talasemia alfa 51t
beta 153f, 154f
beta, identificación de portadores 129, 130
beta, portador 115, 116
beta, técnica de estudio 126t
correlación genotipo-fenotipo 163t
efectos 115f
mutaciones más frecuentes y secuenciación 120
tratamiento 368
Talidomida 20
Tándem, secuencias en 34
TDT 351f, 411g
Telomerasa 299, 411g
Telómero(s) 30t, 34, 75, 411g
repeticiones en tándem 298f
y cáncer 297
Terapia celular 373-375
celular, posibilidades 381
con células madre, requisitos 382, 383
génica 371 y sigs.
génica, posibilidades según enfermedad 379 y sigs.
génica, requisitos 381, 382
Teratoma ovárico 178f, 193
Termociclador para PCR 95
Test(s) de audición 3f
de cribado 411g
de cribado, parámetros 273t
de desequilibrio de transmisión *véase* TDT
de exlusión fetal 412g
del sudor 2
diagnósticos 366-371, 412g
diagnósticos y cribado 272
estadístico de ligamiento 237
familiar de mutación y cáncer de mama 313f, 314
moleculares 366
para la enfermedad de Huntington 368t
predictivo 412g
prenatales 367 y sigs.
validez analítica 412g
Testículos, biopsia 28f
Testosterona, niveles 200
y masculinización cerebral 167
Tetraploidía 46
Tetravalente, estructura 43, 45f
Timina 57
estructura 69t
Tinción Giemsa 27f, 28
Tiopurina metil transferasa *véase* TPMT
Tirosina, estructura 70t
metabolismo 202f
Tirosinemia, alivio de los síntomas 387t
tipo I, tratamiento 385
Toxicidad para las neuronas 150
TPMT 208, 213f
Traducción 56f, 61f, 62
errores 147-149
Transcripción 56f, 60f, 61, 142 y sigs.
controles 70-72
mutaciones de 144, 145
selectividad 71
Transcriptasa inversa 56
Tránscrito primario 60, 69, 412g
Transposón 412g
repeticiones 76f
Traslación 142 y sigs.
Traslocación(es) 29t, 30t, 44f, 142 y sigs., 412g
constitucional equilibrada 43
cromosómica, técnica de estudio 126t
desequilibradas 44
recíprocas 46, 47, 64
robertsoniana 29t, 47, 49f
X:autosoma 191, 192
Trasplante de médula ósea 380
de órganos 209
Tratamiento 371-375, 384 y sigs.
basado en vectores 371, 372
enfermedades con posibilidades 377 y sigs.
mediado por receptores 371
Trauma de nacimiento 9
Treonina, estructura 70t
Triplete de aminoácidos 62
Triploidía 30t, 32t, 46, 412g
Tripsina, digestión con 27f, 28
imnunorreactiva *véase* IRT
Triptófano, estructura 70t
Trisomía(s) 30t, 43f, 412g
21 29t, 39f, *véase también* Síndrome de Doown
47,XXX 32t
autonómicas 32t
y dosificación 165
Tumor(es) carotídeos 193t
de ovario, perfil de expresión 323f
del saco endolinfático 324t
maligno, habilidades 296t
perfil de expresión 322-324
secundarios 296t
y NF1 18t

UAA, codón de parada 62
UAG, codón de parada 62
UDP 186, 188, 403g
origen 189f
y AS 190t
y PWS 190t
UGA, codón de parada 62
Umbral, concepto 332, 333
Upstream, secuencia 59t
Uracilo 57
estructura 69t

Valina, estructura 70t
Valor predictivo positivo 412g
Valproato 386
Variación C/T, detección 122f
Variante común, hipótesis 354
Vector(es) 412g
  de clonación 92t
  integrantes 371, 372
  no integrantes 371, 372
  VIII de la sangre de cerdo 231f
Vellosidades coriales 28t, 412g
  coriales, biopsia 367f-369
Vesícula y fibrosis quística 3t
Virus del sarcoma de simio 300t
  transformante agudo 299
Vista, problemas 5
Vitamina C, incapacidad de producir 217t
  K epóxido reductasa 221

Warfarina 207t

X-SCID 173, 174f, 184
  identificación del gen 216
  y terapia génica 380

YAC 92t

UNIVERSIDAD HISPANOAMERICANA
Fecha de adquisición 02 / 02 / 2022
Compra ☒ Donación ☐
Proveedor: Edic. Iberoamericana
Precio: ₡ 98.000

NUEVA GENÉTICA CLÍNICA

Para todas las personas que están implicadas en la genética médica, la *Nueva Genética Clínica* proporciona una guía única basada en las tecnologías postgenómicas. Tanto si el lector es un estudiante de medicina, un consejero genético o un genetista clínico, este libro ofrece nuevas perspectivas, con descripciones de los más modernos análisis moleculares relacionados con casos clínicos reales para mostrar de qué forma la genética actúa en la clínica.

Cada capítulo responde a preguntas comunes, como

- ¿Qué podemos aprender de la historia familiar?
- ¿Cómo funcionan los genes?
- ¿Cómo se puede estudiar el ADN de los pacientes para buscar mutaciones de un gen?
- ¿Qué es la epigenética?
- ¿Debería analizarse la susceptibilidad genética a las enfermedades comunes?
- ¿Que podemos hacer con una enfermedad genética?

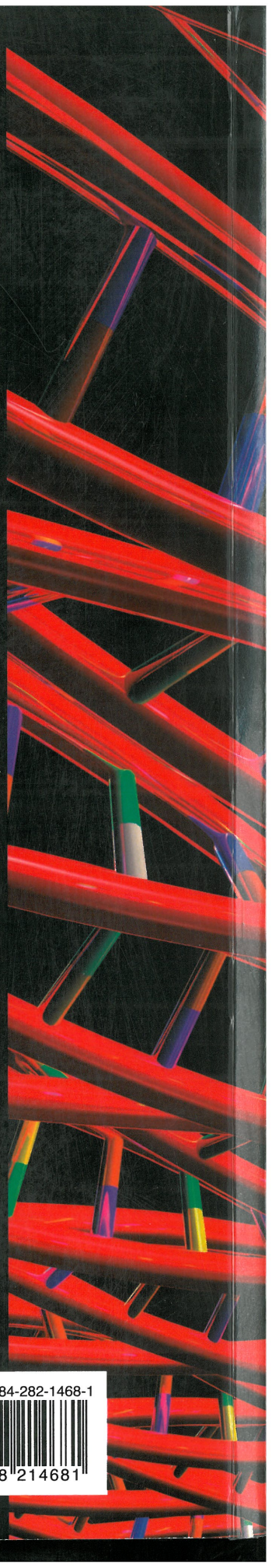
Dentro de cada capítulo, los autores han integrado historias clínicas reales con los conceptos básicos de genética humana permitiendo que el lector vea cómo el conocimiento se puede aplicar en la práctica. Además, este enfoque permite que el lector elija diferentes rutas de lectura del libro:

- Aquellos que prefieran un enfoque basado en un problema, pueden empezar con las secciones de *Historias clínicas* y de *Estudio de pacientes* para introducirse en la genética relacionada con cada caso, utilizando las secciones científicas como material de referencia.
- Aquellos que prefieran un enfoque más didáctico, pueden concentrarse en el aspecto científico de las secciones *Antecedentes* y *Resumen y ampliación*, remitiéndose a las *Historias clínicas* para ilustrar la aplicación práctica de la genética en un contexto clínico.

Todos los capítulos finalizan con ejercicios de autoevaluación de forma que el lector pueda comprobar que domina la materia.

Andrew Read es profesor de Genética humana y **Dian Donnai** es profesor de Genética médica, ambos en la Universidad de Manchester.

"¡Un refrescante enfoque nuevo orientado al paciente. Conceptualmente brillante!"
David N. Cooper, profesor de Genética molecular humana, Universidad de Cardiff



EDICIONES OMEGA
www.ediciones-omega.es

ISBN 978-84-282-1468-1