

Actualidades de la genética molecular en medicina*

I. Introducción

FABIO SALAMANCA GOMEZ**

No puede pasar desapercibido en nuestro medio científico, y menos en la Academia Nacional de Medicina, el hecho de que en este año se cumplen precisamente cuatro décadas del significativo hallazgo de Watson y Crick¹, que revolucionó la biología contemporánea. Hace cuarenta años por primera vez se lograba descifrar la estructura del material genético, del ácido desoxirribonucleico o ADN, espléndidamente plasmada en la figura artística de la doble hélice, realizada por Odile Crick, esposa de Crick, que acompañó el artículo original publicado en *Nature*, el 25 de abril de 1953¹.

El desarrollo de la genética humana, en este lapso, ha sido impresionante. La décima edición del catálogo de McKusick² incluye 5,710 padecimientos que se transmiten con patrón de herencia mendeliana simple. Por otra parte, con los logros de las técnicas de bandas citogenéticas³ se conocen en la actualidad cerca de 500 síndromes de etiología cromosómica. Pero los logros más impresionantes han sido alcanzados gracias al portentoso desarrollo de las técnicas de ingeniería genética, mediante el empleo de las enzimas de restricción⁴, y más recientemente a la revolucionaria metodología de la reacción en cadena de la polimerasa⁵, que permite la amplificación enzimática de segmentos específicos del ADN y, por lo mismo, la obtención de millones de copias del segmento génico en un tiempo relativamente breve. La enorme trascendencia de este hallazgo fue destacada por la revista *Science* al designar a

la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) como la molécula del año⁶.

La interrelación de estos avances ha permitido alcanzar la era de la citogenética molecular y se ha superado la cifra de 3,000 genes localizados en los cromosomas humanos. Dentro de estas localizaciones destacan por su interés e importancia, la fibrosis quística del páncreas en el cromosoma 7⁷, la del gen de la corea de Huntington en el cromosoma 4⁸, el de la neurofibromatosis en el cromosoma 17⁹, el del síndrome de Wardenburg en el cromosoma 2¹⁰, el del síndrome de Rubinstein-Tayby en el cromosoma 16¹¹, un gen responsable de esquizofrenia en el cromosoma 5¹², otro de psicosis maniaco depresiva en el cromosoma 11¹³, y cuando menos tres genes responsables de la enfermedad de Alzheimer: uno en el cromosoma 21¹⁴, otro en el 19¹⁵ y más recientemente otro en el cromosoma 14¹⁶.

No sólo se han localizado genes responsables de patología, lo que constituye el mapa mórbido de los cromosomas humanos, sino también genes que cumplen muy importante función en el organismo, como el gen de la glicogenofosforilasa muscular en el cromosoma 11¹⁷, el de la acetilcolinesterasa en el cromosoma 7¹⁸ y el gen de la triptófano hidrolasa en el cromosoma 11¹⁹.

Con relación a los padecimientos mendelianos la localización de genes ha hecho posible el diagnóstico de los portadores de genes autosómicos recesivos²⁰, de las portadoras de genes ligados al cromosoma X²¹, el diagnóstico prenatal de estas entidades²², lo que ha cambiado radicalmente el asesoramiento genético, al permitir el diagnóstico *in utero* de padecimientos que se manifiestan en forma tardía en el adulto, tales como la corea de Huntington, la distrofia miotónica y el riñón poliquístico. Pero no solamente se cuenta con aplicaciones en el campo preventivo.

* Presentado en la sesión ordinaria de la Academia Nacional de Medicina el 17 de febrero de 1993

** Académico número uno. Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Jefatura de Investigación Médica, y Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional "Siglo XXI", IMSS.

También se han alcanzado logros espectaculares, desde el punto de vista terapéutico. Ya ha sido posible manipular el gen para la resistencia a la neomicina en células hematopoyéticas del ratón adulto²³, así como el gen de la hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa, lo que constituye una posibilidad de tratamiento en el síndrome de Lesch-Nyhan que presenta deficiencia de esta enzima²⁴. Lo mismo se ha hecho en la deficiencia de adenosina deaminasa que produce defectos en la respuesta inmune y que afecta solamente a las células de la médula ósea, por lo que las células tratadas *in vitro* pueden ser reimplantadas. Asimismo, se han obtenido numerosas cepas de animales transgénicos que han respondido a manipulaciones terapéuticas. Así, por ejemplo, la inyección de los genes de la hormona de crecimiento de la rata en huevos fertilizados de ratón²⁵ y del gen de la globina humana en ratones talasémicos²⁶ han demostrado respuestas espectaculares. En el ratón hipogonadal se pudieron establecer las funciones reproductivas introduciendo el gen de la hormona liberadora de gonadotropina ausente en estos animales²⁷.

Más recientemente se han probado con éxito manipulaciones terapéuticas en padecimientos tan importantes por su frecuencia y por sus manifestaciones clínicas como la fibrosis quística y la distrofia muscular de Duchenne. En el caso de la fibrosis quística se ha establecido que el producto génico es una proteína de membrana que al mutar altera el transporte de cloro. Se ha incorporado el gen normal a distintos vectores y mediante nebulizaciones se introduce *in vivo* a las células epiteliales del árbol bronquial²⁸. En la distrofia muscular se ha manipulado con éxito el gen de la distrofina²⁹.

Con relación a los mecanismos de la diferenciación sexual ha sido clonado el gen responsable de la diferenciación testicular en el humano³⁰, localizado en el brazo corto del cromosoma Y, denominado región de la determinación sexual en el cromosoma Y (SRY por sus siglas en inglés: *sex-determining region on Y chromosome*). En una demostración definitiva de la acción de este gen, ratones cromosómicamente hembras pero que recibieron en forma transgénica el gen SRY se desarrollaron como machos³¹. Este es un logro de la genética molecular que tiene importantes aplicaciones en el estudio de las fallas de la diferenciación sexual en el humano.

Las técnicas de bandas permitieron hacer una más precisa correlación entre las alteraciones cromosómicas y los cuadros clínicos que ocasionan. Sin embargo, algunos rearrreglos cromosómicos pasan desapercibidos a estos análisis. Las técnicas de citogenética molecular, principalmente las de hibridación *in situ* (FISH por sus siglas en inglés), han permitido descubrir translocaciones cromosómicas muy sutiles, responsables de malformacio-

nes congénitas y retardo mental, que comprometen los extremos de los cromosomas o sea los telómeros y que se denominan translocaciones crípticas³². Igualmente se han descrito con estas metodologías deleciones submicroscópicas³³ también responsables de importante patología.

Estas técnicas citogenéticas tienen particular aplicación en el estudio de los factores genéticos y cromosómicos involucrados en el fenómeno de la transformación neoplásica³⁴. Es así como se han descrito alteraciones citogenéticas de enorme utilidad en el diagnóstico y el pronóstico de las leucemias y los tumores sólidos y se ha desembocado en el descubrimiento de los oncogenes y los antioncogenes o genes supresores³⁵. Muy recientemente se ha desarrollado una metodología que permite la visualización e identificación simultánea de múltiples rearrreglos cromosómicos en las neoplasias, es la denominada hibridación genómica comparativa (CGH por sus siglas en inglés)³⁶.

El otro aspecto que reviste notable interés es el estudio de las mutaciones en el ADN mitocondrial (mtADN) no sólo por sus aportes en el entendimiento del proceso evolutivo, sino también por su contribución en el esclarecimiento de patología muy limitante en el humano. Es bien sabido que las mitocondrias se heredan sólo por rama materna, esto ha permitido realizar investigaciones encaminadas a precisar el origen de nuestro primer ancestro femenino, lo que constituye una verdadera búsqueda de Eva, y se ha logrado trazar un árbol evolutivo que culmina en una mujer que vivió hace 200,000 años en el África³⁷. En forma paralela, el estudio molecular del cromosoma Y, que por supuesto sólo se transmite de padre a hijo, permitirá establecer una genealogía que conduzca a Adán.

Por otra parte, es creciente el número de mutaciones que se describen en el mtADN y que producen la atrofia óptica de Leber³⁸, en el síndrome de Kearns-Saige³⁹, en miocardiopatías⁴⁰, y en encefalomiopatías con trastornos convulsivos⁴¹.

Finalmente, estos desarrollos han permitido poner en marcha el proyecto más ambicioso de toda la historia de la investigación biomédica: alcanzar la secuenciación completa de los 3,000 millones de bases nitrogenadas del ADN humano y conocer su ordenamiento a lo largo de cada uno de nuestros cromosomas, lo que se conoce como el Proyecto del Genoma Humano⁴².

Estos avances de la genética molecular en medicina serán tratados en las distintas ponencias del presente Simposio, que constituye un modesto homenaje al cuadragésimo aniversario del modelo de la doble hélice de Watson y Crick, y un anticipo al Simposio Internacional del Genoma Humano, que bajo los auspicios de la Academia de la Investigación Científica y el Programa Latino-

americano del Genoma Humano (PLAGH) se llevará a cabo próximamente en la sede de la Academia Nacional de Medicina, y en el Centro de Convenciones de Oaxtepec, Mor., del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Referencias

- Watson J.D., Crick F.H.C. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acids. *Nature*. 1953;171: 737.
- McKusick V.A. Mendelian Inheritance in Man. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1992.
- Salamanca F. Citogenética Humana. Fundamentos y Aplicaciones Clínicas. Editorial Médica Panamericana. México, D.F. 1990.
- Nathans D., Smith H.O. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Ann Rev Biochem*. 1975;44: 273-296.
- Mullis K.B. The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific Amer*. 1990;262: 43-46.
- Guyer R.L., Koshland D.E. The molecule of the year. *Science*. 1989, 246: 1543-1546.
- Knewlton R.G., Cohen-Haguenauer O., Tsui L.C., Buchwald M., Donis-Keller H. A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located in chromosome 7. *Nature*. 1985;318: 380-382.
- Gusella J.F., Tanzi R.E., Anderson M.A. DNA markers for neurofibrillary diseases. *Science*. 1984;225: 1320-1325.
- Wallace M., Marchuck D.A., Andersen L.B., Collins F.S. Type I neurofibromatosis gene: Identification of a transcript disrupted in three NF1 patients. *Science*. 1990;249:181-186.
- Foy C., Newton V., Wellstey D., Harris R., Read A.P. Assignment of the locus for Waardenburg syndrome type I to human chromosome 2q37 and possible homology to the *Spotch* mouse. *Am J Hum Genet*. 1990;46: 1017-1023.
- Breuning M.H., Danverse H.G., Fugazza G., Sans J.J., Spruit L., Wijnen H. et al. Rubinstein-Taybi syndrome caused by submicroscopic deletions within 16p13.3. *Am J Hum Genet*. 1993;52: 249-254.
- Sherrington R., Brynjolfsson J., Petursson H., Dobbs M., Gurlin H. Localization of a susceptibility locus for schizophrenia on chromosome 5. *Nature*. 1988;336:164-167.
- Engelard J.A., Gerhard D.S., Pauls D.L., Kidd K.K., Housman D.E. Bipolar affective disorder linked to DNA Markers on chromosome 11. *Nature*. 1987;325: 783-785.
- Tanzy R.E. Amyloid protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science*. 1987;235: 880-884.
- Pericak-Vance M.A. Linkage studies in familial Alzheimer disease. Evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet*. 1991;48: 1034-1050.
- Schellenberg G.D. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 1992; 258: 668-671.
- Lichter P., Tang C.J., Call K.G., Hermanson G., Evans GA., Housman D., Ward DC. High resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science*. 1990;247: 64-69.
- Getman DK, Eubanks JI, Camp S, Evans GA, Taylor P. The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. *Am J Hum Genet* 1992;51: 170-177.
- Nielsen D.A., Dean M., Goldman D. Genetic mapping of the human tryptophan hydroxylase gene on chromosome 11, using an intronic conformational polymorphism. *Am J Hum Genet* 1992, 51: 1366-1371.
- Salamanca F. Asesoramiento genético. En: Introducción a la Pediatría. Palacios J (Ed.). Méndez Oteo, México D.F., 1988, pp. 875-895.
- Koenig M., Bertelson C.J, Monaco AP, Hoffman E, Feener CC, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy and preliminary genomic organization of the gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987;50: 509-516.
- Salamanca F. Nuevas fronteras de la genética humana y sus implicaciones. III. Diagnóstico prenatal y terapéutica in utero. *Gac Med Mex*. 1986;122: 126-129.
- Williams DA, Lemischka IR, Nathan DG, Mulligan RC. Introduction of new genetic material into pluripotent hematopoietic stem cells of the mouse. *Nature* 1984;310: 476-478.
- Miller AD, Eckner RJ, Jolly JD, Friedman I, Verma IM. Expression of a retrovirus encoding human HPRT in mice. *Science* 1984;223: 630-633.
- Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Evans RM. Dramatic growth of mice that develop eggs microinjected with metalothionein-in-growth hormone fusion genes. *Nature* 1982;300: 611-615.
- Constantini F, Chada K, Magram J. Correction of murine beta-thalassemia by gene transfer into the germ line. *Science* 1986;233: 1192-1194.
- Mason AJ, Pitts SL, Wikolicks K, Szony E, Stewart TA. The hypogonadal mouse: reproductive functions restored by gene therapy. *Science* 1986;234 : 1372-1374.
- Collins FS. Cystic fibrosis: Molecular biology and therapeutic implications. *Science* 1992;256: 774-779.
- Wells DJ, Wells KE, Walsh FS, Davies KE, Goldspink G, Love DR et al. Human dystrophin expression corrects the myopathic phenotype in transgenic mdx mice. *Hum Mol Gen* 1992;1: 35-40.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Howkins JR, Griffith BC et al. A gene of the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990;346: 240-244.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. *Nature* 1991;351: 117-121.
- Leibetter D.H. Cryptic translocations and telomere integrity. *Am J Hum Genet* 1992;51: 451-456.
- Fautes JA, Bickmore WA, Fletcher JM, Ballesta F, Hanson IM, Van Heyningen V. Submicroscopic deletions at the WAGR locus, revealed by non radioactive in situ hybridization. *Am J Hum Genet* 1992;51: 1286-1294.

34. Salamanca F. Genética y cáncer. Citogenética y cáncer. Gac Med Mex 1992;128: 110-117.
35. Stanbridge E. Human tumor suppressive genes. Annu Rev Genet 1990; 24: 615-657.
36. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science 1992;258: 818-821.
37. Cann RL. In Search of Eve. The Sciences. N.Y. Acad Sci 1987;Sept-Oct. 30-36.
38. Brown MD, Voljavec A, Lott MT, Torroni A, Yang CC, Wallace DC. Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. Genetics 1992;130: 163-173.
39. Poulton J, Deadman ME, Gardiner RM. Duplications of mitochondrial DNA in mitochondrial myopathy. Lancet 1989; i: 236-240.
40. Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA^{Leu}(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathy. Nature 1990;348:651-653.
41. Wallace DC, Zheng X, Lott MT, Shoffner JM, Hodge JA, Kelley RI et al. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic pathophysiological and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. Cell 1988;55: 601-610.
42. Stephens JC, Cavanaugh MI, Gradie MI, Mador MI, Kidd KK. Mapping the human genome: Current status. Science 1990; 250: 237-244.

II. La genética molecular en el estudio de los padecimientos mendelianos

ALESSANDRA CARNEVALE*

Los padecimientos o caracteres mendelianos son aquellos debidos a la mutación de uno o ambos alelos específicos situados en un *locus* de un par cromosómico. Se clasifican en autosómicos dominantes o recesivos y ligados al X dominantes o recesivos con patrones de transmisión característicos.

Hasta hace poco en la mayoría de estos padecimientos se había caracterizado el fenotipo clínico anormal y el patrón de herencia, pero no había sido posible reconocer la naturaleza molecular ni la fisiopatología del defecto genético. Sin embargo, en los últimos años, la aplicación

de las técnicas de biología molecular al estudio del genoma humano ha permitido localizar e identificar un número cada vez mayor de genes responsables de enfermedades mendelianas.

El análisis de la asociación entre una enfermedad mendeliana y polimorfismos del ADN cuya localización cromosómica es conocida, así como el descubrimiento de pacientes con una de estas enfermedades y a la vez una alteración estructural cromosómica han contribuido a la localización e identificación de diversos genes.

Recordemos que la acción de los genes se refleja en el flujo de información desde el núcleo en el cual, se encuentra el ADN con el código genético hasta la síntesis de una proteína. Este es un proceso sumamente complicado que, en resumen, implica la transcripción del gen (ADN) al precursor del ARN mensajero, los múltiples pasos que transforman el precursor en el ARN mensajero maduro y la traducción del ARN mensajero en un producto proteico. Cuando ocurre un cambio o mutación en el gen o sea en el código genético, éste se manifiesta básicamente en dos formas: o bien en la síntesis de una proteína estructural o funcionalmente anormal o bien en una disminución o ausencia de dicho producto proteico.

Las manifestaciones fenotípicas de la mutación dependerán del tipo de proteína que resulte afectada y de su función en el organismo: enzima, receptor, proteína estructural, hormona, proteína transportadora, proteína que controla el crecimiento o la diferenciación celular entre otras.

El poder reconocer que una enfermedad génica o mendeliana se debe a la anomalía de una proteína en particular, ha sido sumamente importante para comprender su patogénesis y la forma de herencia, así como para enfocar más adecuadamente el tratamiento y la prevención de la misma.

La lista de los padecimientos mendelianos en los cuales se ha identificado y caracterizado el gen responsable, así como el producto proteico está aumentando en una forma extraordinaria, pero en esta ocasión únicamente se mostrarán dos ejemplos en los cuales se han logrado avances espectaculares en el conocimiento de la fisiopatología molecular.

La primera es la fibrosis quística, la enfermedad autosómica recesiva más frecuente en la población caucásica (1 en 2500 niños). El fenotipo se caracteriza principalmente por secreciones mucosas espesas que causan enfermedad pulmonar crónica y grave, insuficiencia pancreática, elevada concentración de cloruros en sudor y detención en el crecimiento así como azoospermia en los varones¹.

En 1989, mediante el estudio de los polimorfismos del ADN, se identificó el gen responsable de la fibrosis quística en el cromosoma 7^{2,3}. Este es un gen de 25,000 pares de

*Jefe de la División de Investigación Médica, Instituto Nacional de Pediatría

bases que produce un transcrito de 6500 bases y se traduce en una proteína de 1480 aminoácidos (Fig. 1). La identificación de este gen hizo realidad la promesa de que las estrategias de la biología molecular habrían de poner en manos de los científicos de la medicina, los genes responsables de enfermedades hereditarias, aunque en un principio se desconocieran por completo la localización del gen y la función de la proteína normal. Al conocer la secuencia del gen, se pudo caracterizar la estructura del producto proteico, la proteína denominada reguladora de la conductancia transmembranal (CFTR) que es una proteína de membrana dependiente de ATP que tiene función de canal de cloro⁴. Su ausencia o su estructura anormal, altera el transporte del cloro a través de las membranas epiteliales y explica la fisiopatología de las manifestaciones clínicas de los pacientes. Por otra parte, con el estudio molecular de miles de pacientes con fibrosis quística en diferentes países, se ha reconocido que el gen puede sufrir más de 200 diferentes mutaciones, cuya frecuencia varía según las poblaciones⁵. Además, se ha observado que existe correlación entre el tipo de mutación y las manifestaciones clínicas, ya que mientras algunas mutaciones causan cuadros clínicos graves, otras producen manifestaciones leves. De hecho, parece evidente que cuando la mutación genera un codón o señal de terminación y no se produce la proteína, el cuadro clínico es más leve que cuando la mutación altera la estructura de la proteína y ésta no logra llegar a la membrana citoplasmática y se queda atrapada en el retículo endoplásmico^{6,7}. En México varios laboratorios han iniciado el estudio molecular en pacientes con fibrosis quística y los primeros resultados, por lo menos en uno de ellos, sugiere que la mutación delta-F508, la más común en poblaciones caucásicas (70%), es menos frecuente en los pacientes mexicanos^{8,9} (Cuadro I).

Al conocer la estructura del gen, la estructura y la función de su producto proteico y, por lo tanto, la fisiopatología de la enfermedad, han mejorado las estrategias terapéuticas con el uso de amiloride, a-1-antitripsina y ATP en aerosol y DNasa humana. Pero además, se plantea la posibilidad de la terapia génica mediante la incorporación del gen normal a diversos tipos de vectores, y la introducción del mismo a las células defectuosas. Uno de los vectores que se han utilizado es un adenovirus al que se le ha incorporado el gen normal con todo su sistema de regulación; este sistema vector se ha introducido a las células epiteliales en cultivo obtenidas del árbol bronquial de los pacientes. Con anticuerpo monoclonal anti-proteína CFTR se ha observado que las células que han incorporado el virus con el gen normal son capaces de producir la proteína con lo cual se corrige el defecto¹⁰. Ahora falta introducir este sistema a las células del árbol bronquial de

los pacientes, con el objeto de corregir el defecto a ese nivel, ya que el compromiso pulmonar es el que produce las manifestaciones clínicas más graves. Esto parece poder resolverse mediante un sistema nebulizador y en este sentido se han encaminado las investigaciones más recientes.

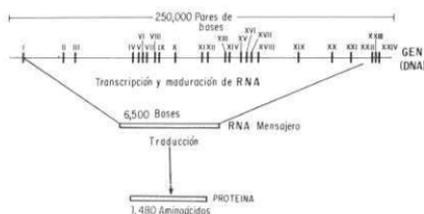


Figura 1. El esquema representa el gen responsable de la fibrosis quística de 250,000 pares de bases, con 24 exones, que se transcribe a un ARN mensajero de 6500 bases y se traduce en una proteína de 1480 aminoácidos.

Cuadro I. DISTRIBUCION DE LA MUTACION DELTA-F508 EN DIFERENTES PAISES

PAIS	CROMOSOMAS FQ ESTUDIADOS		
	F508	(%)	
USA*	2372	1683	71
CANADA**	466	330	71
ARGENTINA*	92	58	63
INGLATERRA*	1548	1184	76
ESPAÑA*	608	331	54
ITALIA*	1128	573	47
MONTERREY**	22	13	59
CD. MEXICO***	100	39	39

* REF 5, ** REF 8, *** REF 9.

El segundo ejemplo lo constituyen las distrofias musculares tipo Duchenne y Becker. En ambas enfermedades los pacientes sufren de destrucción progresiva de los músculos con debilidad muscular progresiva, que lleva al paciente a la invalidez y a la muerte. En la actualidad, desde el punto de vista clínico, se considera que la forma grave es la que corresponde a la clásica distrofia tipo Duchenne, en la cual los pacientes pierden la deambulación independiente antes de los 12 años; la forma leve es el tipo Becker

en la cual el daño muscular es mucho más leve y los pacientes pierden la deambulación después de los 16 años y pueden sobrevivir hasta la 5a década; un tercer grupo de pacientes tiene una forma moderada con un pronóstico intermedio y dejan de caminar entre los 12 y 16 años¹¹.

Desde hace tiempo se sabía que eran enfermedades recesivas ligadas al X, y se pensaba que eran causadas por mutaciones en genes diferentes. La clave para mapear el gen de la distrofia tipo Duchenne en el cromosoma X la proporcionaron algunos casos de mujeres afectadas, que presentaban alteraciones estructurales del X que involucraban invariablemente la banda p21 en el brazo corto¹² y un paciente masculino, con una delección del brazo corto del X que tenía 4 enfermedades ligadas al X, entre ellas, la distrofia tipo Duchenne. Esto sugirió que el gen debiera encontrarse en dicha región y la localización precisa se obtuvo por análisis de ligamiento mediante polimorfismos del ADN que flanqueaban la región¹³.

La caminata cromosómica y el hallazgo de un gran transcrito de RNA mensajero presente en el tejido muscular y ausente en otros tejidos, permitió identificar el gen más grande conocido hasta la fecha que consta de 2,400 kb y 65 exones¹⁴. Este gen codifica para una proteína de 427 kD que se denominó distrofina¹⁵. Esta es una proteína que se localiza en la membrana, en el lado intracitoplásmico que se ancla a las proteínas de la membrana de las fibras musculares (Fig. 2) y parece tener una función amortiguadora durante los procesos de contracción y relajación de las fibras musculares¹⁶. Desde los primeros estudios moleculares en pacientes con distrofia tipo Duchenne y tipo Becker se demostró que el gen responsable es el mismo y que las mutaciones que lo afectan, principalmente delecciones, alteran de diferente manera la síntesis de la distrofina. En general, se ha visto que en los casos de distrofia muscular tipo Duchenne (la forma más grave), las delecciones resultan en codones de terminación inmediatamente después de la delección y producen una proteína truncada e inactiva, mientras que en los casos de distrofia muscular tipo Becker (la forma leve), las delecciones encontradas en los pacientes producen una proteína más corta pero parcialmente funcional^{17,18}. Los estudios del tejido muscular con anticuerpos antidistrofina indican ausencia de la proteína en las fibras musculares de los casos de distrofia tipo Duchenne, mientras que en los casos moderados o leves se observan zonas de fibras con distrofina anormal y zonas de fibras que no la contienen¹⁹.

Las investigaciones más recientes han demostrado que además de la distrofina del músculo, existen por lo menos otros tres tipos de distrofina codificados por el mismo gen, pero sintetizados a partir de transcritos alternativos regulados por promotores específicos. Estos diferentes tipos de

distrofina tienen una distribución altamente selectiva en diversas áreas cerebrales, su papel todavía se desconoce pero parecen tener importantes funciones en los circuitos cerebrales²⁰. Además, varios grupos de investigación se han enfocado a la terapia génica en esta enfermedad tan invalidante y hasta ahora sin ninguna perspectiva de tratamiento²¹.

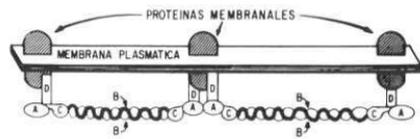


Figura 2. Modelo hipotético de la estructura de la distrofina asociada a las proteínas membranales. Tomado de Hoffman y Kunkel¹⁶.

Referencias

- Boat TF, Welsh MJ, Beaudet AL, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, (eds.) The Metabolic Basis of Inherited Disease 6th ed. New York: McGraw-Hill, 1989:2649-80.
- Riordan J, Rommens J, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavac N, Chou JL, Drumm M, Ianuzzi M, Collins F, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989;245:1066-73.
- Kerem BS, Rommens J, Buchanan J, Markiewicz D, Cox T, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989;245:1074-80.
- Hasegawa H, Skach W, Baker O, Calayag MC, Lingappa V, Verkman AS. A multifunctional aqueous channel formed by CFTR. *Science* 1992;258:1477-1479.
- Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Worldwide survey of the delta-F508 mutation. Report from the cystic fibrosis genetic analysis consortium. *Am J Hum Genet* 1990;47:354-9.
- Kerem E, Corey M, Kerem B, Rommens J, Markiewicz D, Levigon H, Tglli L, Duric P. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis - analysis of the most common mutation (delta-F508). *N Engl J Med* 1990; 323:1517-22.
- Hamosh A, Trapnell BC, Zeitlin PL y col. Severe deficiency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

- messenger RNA carrying nonsense mutations R553X and W1316X in respiratory epithelial cells of patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1991;88:1880.
8. Rojas-Martínez A, Vazquez-Alemán RM, Gustincich S, Cantú JM, Barrera-Saldaña HA. Genética molecular de la fibrosis quística: el alelo Delta-F508 en familias mexicanas. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1992; 49:335-41.
 9. Orozco L, Salcedo M, Lezana JL, Valdez H, Moreno M, Carnevale A. Frequency of delta-F508 in a Mexican sample of cystic fibrosis patients. *J Med Genet*. 1993 (en prensa).
 10. Rosensell HA, Yoshimura K, Trapnell BC, y col. In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulation gene to the airway epithelium. *Cell* 1992;68:143-55.
 11. Nicholson LVB, Kushby RMT, Johnson MA, den Dunnen JT, Ginjaar IB, van Ommen GJB. Predicted and observed sizes on dystrophin in some patients with gene deletions that disrupt the open reading frame. *J Med Genet* 1992;29:892-96.
 12. Jacobs PA, Hunt PA, Mayer M, Bart RD. Duchenne (DMD) muscular dystrophy in a female with an X-autosome translocation: further evidence that the DMD locus is at Xp21. *Am J Hum Genet* 1981;33:513.
 13. Kunkel LM, Monaco AP, Middlesworth W, Ochs HO, Latt SA. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X-chromosome deletion. *Proc Natl. Acad Sci USA* 1985;82:4778.
 14. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Femer C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987;50:509.
 15. Salcedo-Vargas M, Orozco-Orozco L. Genética molecular de las distrofias musculares tipos Duchenne y Becker. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1992;49:115.
 16. Hoffman EP, Kunkel LM. Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron* 1989;2:1019.
 17. Bulman DE, Murphy EG, Zubrzycka-Gaarn EE, Worton RG, Ray PN. Differentiation of Duchenne and Becker muscular dystrophy phenotype with amino and carboxy-terminal antisera specific for dystrophin. *Am J Hum Genet* 1991;48:295.
 18. Gangopadhyay SB, Sherratt TG, Heckmatt JZ y col. Dystrophin in frameshift deletion patients with Becker muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 1992;51:562.
 19. Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Karpati G y col. The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 1988;333:466.
 20. Górecki DC, Monaco AP, Derry JMJ, Walker AP, Barnard EA, Barnard PJ. Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Human Mol Genet* 1992;1:505.
 21. Law P. Duchenne therapy trials starting in US, Canada. *J Natl Inst Health* 1990;54:5.

III. Análisis molecular de secuencias del cromosoma Y en pacientes con trastornos de la diferenciación sexual

SUSANA KOFMAN-ALFARO*
 MARISOL LOPEZ LOPEZ**
 LEDA C. TORRES MALDONADO*

En condiciones normales el cromosoma Y en mamíferos actúa como determinante masculino. Así, individuos XY, XXY o XYY son masculinos, mientras que XO, XX o XXX son femeninos. Otra característica de los mamíferos es que los caracteres sexuales secundarios, están regulados por hormonas producidas por las gónadas y no por acción génica directa. Esto implica que la determinación sexual es equivalente a la diferenciación gonadal y como aparentemente el ovario se diferencia en ausencia de señales específicas, la determinación sexual gonadal es equivalente a la diferenciación testicular. Para que la diferenciación testicular se lleve a cabo se requiere la presencia del cromosoma Y, particularmente de un factor determinante testicular (TDF) que codifique en el Y. Además existe en el genoma un número no determinado de genes que actúan en la cascada génica que diferencia al testículo. En ausencia de cromosoma Y, esta serie de genes no se activa, de tal manera que la gónada fetal se diferencia en forma pasiva hacia el ovario¹.

En 1987 Page y colaboradores² estudiando a pacientes con reversión sexual (varones XX y mujeres XY) reconocieron la existencia de un gen en los brazos cortos del cromosoma Y al que denominaron ZFY (*zinc finger protein on Y chromosome*) y lo propusieron como TDF. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que esta región, aparentemente relacionada con la espermatogénesis, no corresponde al factor determinante testicular^{3,5}.

En 1990 Sinclair y cols.⁶ demostraron que el fragmento más pequeño del cromosoma Y relacionado con la diferenciación testicular contiene aproximadamente 35kb y se encuentra próximo a la región pseudoautosómica. Este fragmento, denominado SRY (*sex-determining region on Y chromosome*), satisface los criterios esperados para TDF:

* Servicio de Genética, Hospital General de México, SSA.
 Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria, UNAM
 ** Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-X

está conservado en todos los mamíferos euterios y se expresa en los tejidos somáticos de la cresta genital del ratón en el momento de la diferenciación testicular⁷. Es interesante señalar que SRY codifica para una proteína que incluye un motivo relacionado con la caja HMG de las proteínas de alta movilidad. Las secuencias asociadas con la caja HMG tienen características de factores de transcripción⁸.

Además de estos genes en el brazo corto del cromosoma Y, se ha reconocido la presencia de secuencias alfoides repetidas específicas de la región centromérica de este cromosoma⁹.

En los últimos años, la metodología molecular y la disponibilidad de sondas moleculares y oligonucleótidos específicos para SRY, ZFY y regiones alfoides centroméricas del cromosoma Y han sido útiles para identificar estas secuencias en el genoma de pacientes con diferentes anomalías de la diferenciación sexual.

El desarrollo de esta tecnología en el servicio de Genética del Hospital General de México, SSA nos ha permitido analizar desde el punto de vista molecular un número importante de pacientes que habían sido previamente diagnosticados en colaboración con el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Nos abocamos preferentemente al estudio de pacientes con reversión sexual (hermafroditas verdaderos 46,XX, varones XX y mujeres XY) y pacientes con fenotipo de síndrome de Turner con diferente constitución cromosómica.

Los resultados revelaron que el hermafroditismo verdadero XX y el síndrome de varón XX son padecimientos genéticamente heterogéneos y pueden ocurrir por un intercambio desigual entre el X y el Y durante la meiosis paterna, o por una mutación en alguno de los genes autosómicos que participan en la cascada génica que conduce a la diferenciación testicular. La figura 1 muestra una hibridación DNA-DNA para el gen ZFY en el genoma de dos varones XX y dos hermafroditas verdaderos XX y en controles normales (femenino y masculino).

La metodología permite también diagnosticar con certeza el origen de cromosomas marcadores en pacientes con fenotipo de Turner utilizando sondas centroméricas del Y u oligonucleótidos específicos para esta región. Esto es clínicamente importante, ya que la presencia de cromosoma Y o de marcadores derivados de éste, ha sido asociada con un riesgo elevado de malignización gonadal por lo que en estas pacientes se recomienda gonadectomía bilateral^{10,11}. En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos por la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos para el Y en dos pacientes 45,X/46,X,+ mar con fenotipo de síndrome de

Turner. En ambos casos el marcador era un anillo pequeño cuyo origen no pudo ser demostrado por métodos citogenéticos. Los resultados mostraron que el marcador de una de las pacientes correspondía a un cromosoma Y mientras que en la otra era derivado del X¹².

Los datos presentados demuestran que las técnicas moleculares permiten reconocer la etiología de algunos

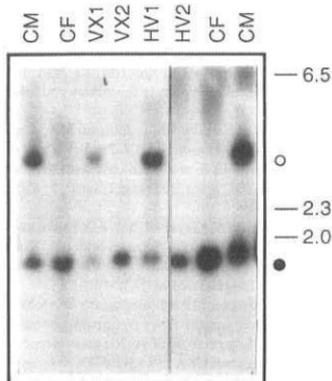


Figura 1. Hibridación DNA-DNA en fase sólida utilizando la sonda pDP 1007 (gen ZFY en Yp11.3). CM: control masculino, CF control femenino, VX1 y VX2: varones 46,XX, HV1 y HV2: hermafroditas verdaderos 46,XX. Se observa la banda de 3.5 kb correspondiente al gen ZFY en los dos CM, en VX1 y en HV1. En todos los casos se observa la banda de 1.8 kb correspondiente al gen homólogo ZFX en Xp21.3. Se utilizó como marcador de peso molecular al fago lambda digerido con HindIII.

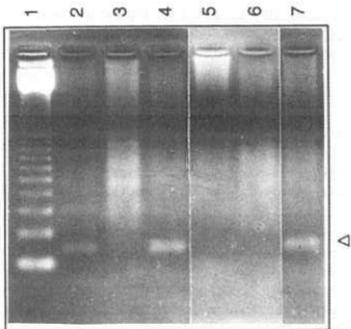


Figura 2. Amplificación de la región centromérica del Y mediante la reacción en cadena de la polimerasa visualizada en un gel de agarosa de 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: marcador de peso molecular (escala de 123 pb). Carriles 2 y 7: control masculino. Carriles 3 y 6: control femenino. Carril 4: 45,X/46,X(Y). Carril 5: 45,X/46,X(X).

padecimientos y son útiles en el diagnóstico preciso de anomalías cromosómicas

Agradecimientos

Este proyecto fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM y por el Proyecto Universitario de Investigación en Salud, UNAM.

Agradecemos la colaboración del doctor Guillermo Alfaro del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Referencias.

1. McLaren A. Sex determination in mammals. *Trends Genet* 1988;4:153-157.
2. Page D C, Mosher R, Simpson E M, Fisher E M C, Mardon G, et al. The sex determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 1987;51:1091-1104.
3. Sinclair A H, Foster J W, Spencer J A, Page D C, Palmer M, et al. Sequences homologous to ZFY, a candidate of human sex determining gene are autosomal in marsupials. *Nature* 1988; 336: 780-783.
4. Palmer M S, Sinclair A H, Berta P, Ellis N A, Goodfellow P N, et al. Genetic evidence that ZFY is not the testis determining factor. *Nature* 1989; 342: 937-939.
5. Koopman P, Gubbay J, Collignon J, Lovell-Badge R. ZFY gene expression patterns are not compatible with a primary role in mouse sex determination. *Nature* 1989;342:940-942.
6. Sinclair A H, Berta P, Palmer M S, Hawkins J R, Griffith B L, et al. A gene of the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990; 346: 240-244.
7. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. *Nature* 1991; 351: 117-121.
8. Hawkins J R, Sinclair A H. Identification and isolation of SRY, a gene from the sex-determining region of the Y chromosome. *Seminars in Developmental Biology* 1991; 2: 251-258.
9. Wolfe J, Darling S M, Erickson R P, Craig I, Buckle V, et al. Isolation and characterization of an alphoid centromeric repeat family from the human Y chromosome. *J Mol Biol* 1985; 182: 477-485.
10. Scully R E. Gonadoblastoma. A review of 74 cases. *Cancer* 1970; 25: 1340-1355.
11. Mendez JP, Ulloa-Aguirre A, Kofman-Alfaro S, Mutchinick O, Fernandez del Castillo C et al. Mixed gonadal dysgenesis: clinical, cytogenetic, endocrinological and histopathological findings in 16 patients. *Am J Med Genet.* (En prensa).
12. López López M., Torres Maldonado LC, Méndez JP, Cervantes Peredo A, canto Cetina Petal. Detección molecular de secuencias de DNA derivadas del cromosoma Y en pacientes con síndrome de Turner. *Rev Inv Clin.* (En prensa).

IV. La genética molecular en el estudio de los rearrreglos estructurales cromosómicos

FABIO SALAMANCA GOMEZ

Los impresionantes avances actuales de la genética humana han sido alcanzados gracias al desarrollo, por una parte, de las técnicas de la genética molecular, mediante el empleo de las enzimas de restricción o endonucleasas¹ y más recientemente con el uso de la reacción en cadena de la polimerasa² que permite la obtención de millones de copias de un segmento génico en un tiempo relativamente breve. Por otra parte, el avance se ha logrado gracias al desarrollo de las técnicas de bandas cromosómicas³ y a muy recientes metodologías que revisaremos en esta presentación. La interrelación de todos estos logros ha permitido alcanzar la era de la citogenética molecular.

Es así como se han desarrollado sondas específicas o marcadores para cada uno de los cromosomas, lo que ha permitido la identificación de aberraciones cromosómicas en células en interfase, es decir, sin necesidad de recurrir al cultivo de las células *in vitro* y a la obtención de cromosomas, mediante las técnicas de hibridación *in situ* que se conocen por sus siglas en inglés como FISH (*Fluorescence in Situ Hybridization*)⁴.

Durante muchos años en citogenética se había ambicionado alcanzar tal grado de simplificación metodológica. Casi desde los inicios de la citogenética se había establecido la correlación entre el número de corpúsculos de Barr (cromatina X) y el número de cromosomas X presentes en la célula. Así, el número de corpúsculos es uno menos que el número de cromosomas X. Por esta razón las mujeres normales, que tienen dos cromosomas X presentan un corpúsculo de cromatina, los varones normales, que tienen un sólo cromosoma X, y las pacientes con monosomía del cromosoma X o síndrome de Turner, cuando no son mosaicos, carecen de corpúsculo de cromatina; los pacientes con síndrome de Klinefelter (47,XXY) son cromatino positivos; y las pacientes con trisomía del cromosoma X (47,XXX) presentan dos corpúsculos de Barr⁵.

En forma similar, se había logrado establecer la correlación entre el número de corpúsculos F (cromatina Y) y el número de cromosomas Y presentes en la célula⁶. Así, el varón normal (46,XY) tiene un corpúsculo F, pero el varón 47,YYY presenta dos corpúsculos de cromatina Y.

En la actualidad es posible hacer la identificación simultánea del complemento XY en células en interfase,

Propiedad de la
Academia N. de Medicina
de México

mediante hibridación *in situ* y tinción diferencial de cada uno de estos gonosomas⁷. Esto tiene grandes aplicaciones para la identificación rápida de anomalías del complemento gonosómico o sexual, y para el diagnóstico prenatal en menos de 24 horas de tales anomalías gonosómicas⁸. Por supuesto, es posible identificar de la misma manera las aneuploidías autosómicas como el síndrome de Down (47,XX o XY, +21), el síndrome de Edwards (47,XX 6 XY, +18) y el síndrome de Patau (47,XX 6 XY, +13)⁹.

Pero tal vez el aporte más significativo de estas metodologías haya sido el permitir la identificación de aberraciones cromosómicas estructurales que pasan desapercibidas incluso al análisis con técnicas de bandas de alta resolución. Tal es el caso de las translocaciones crípticas¹⁰ y de las deleciones submicroscópicas¹¹. Las translocaciones crípticas son rearrreglos estructurales muy sutiles, responsables de malformaciones congénitas y retardo mental, que comprometen los extremos de los cromosomas, o sea sus porciones teloméricas.

Podemos ilustrar estos rearrreglos refiriéndonos a los genes que codifican para las cadenas alfa de la molécula de la hemoglobina. Como se sabe, la hemoglobina del adulto es un tetramero constituido por dos cadenas alfa y dos cadenas beta. Los genes que codifican para las cadenas beta están localizados en el brazo corto del cromosoma 11¹² y los que codifican para las cadenas alfa se localizan en la porción telomérica del brazo corto del cromosoma 16¹³.

Una de las hemoglobinas anormales está constituida sólo por cadenas beta y se conoce como hemoglobina H (beta-4). Uno de los primeros casos descritos con translocación críptica correspondía a un niño con hemoglobina H, pero que además presentaba malformaciones congénitas y retardo mental¹⁴. El cariotipo por técnicas de bandas era aparentemente normal. Utilizando técnicas moleculares de hibridación *in situ* se descubrió un sutil rearrreglo terminal en los cromosomas del paciente y sorprendentemente se encontró también, en estado balanceado, en la madre del paciente (Fig. 1). La madre mostraba los genes para la cadena alfa en un solo cromosoma 16, ya que el extremo terminal o telomérico del otro cromosoma 16 se había translocado en la porción telomérica de un cromosoma 1. Esta translocación no era identificable por análisis de bandas cromosómicas. Su hija, hermana del paciente, tenía hemoglobina normal, pero presentaba retardo mental, ya que portaba la translocación recíproca no balanceada al tener un cromosoma 1 sin su extremo normal telomérico, ya que llevaba la porción telomérica correspondiente al cromosoma 16. En forma similar las técnicas de FISH han sido útiles para descubrir translocaciones crípticas en el síndrome de Miller-Dieker. Este es un

síndrome caracterizado por lisencefalia, o sea ausencia de circunvoluciones cerebrales o agiria, microcefalia, mandíbula pequeña, facies peculiar, disfgia, decorticación y posturas de decerebración, retardo en el crecimiento, profundo retardo mental y muerte antes de los seis meses de edad¹⁵. Puede haber malformaciones asociadas en corazón, riñones y otros órganos, así como polidactilia¹⁶.

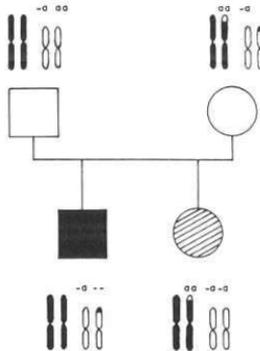


Fig. 1. Translocación críptica entre la porción telomérica del cromosoma 1p y el cromosoma 16p. La madre es portadora de esta translocación y ha heredado a su hijo el cromosoma 16 sin su extremo normal telomérico. Este hijo tiene retardo mental y hemoglobina H, ya que carece de genes alfa para la hemoglobina. La hermana tiene retardo mental pero posee hemoglobina normal, ya que recibió el cromosoma 1 que lleva el extremo telomérico del cromosoma 16.

En una familia cuya hija tenía síndrome de Miller-Dieker, cuyo cariotipo por técnicas de bandas era aparentemente normal, se descubrió en la madre utilizando técnicas FISH, una translocación críptica telomérica entre los cromosomas 3 y 17 [t(3q;17p)]¹⁷. La madre tenía un cromosoma 17 sin su porción telomérica del brazo corto que había sido translocada en forma recíproca al telómero del brazo largo del cromosoma 3. Por consiguiente, la hija tenía síndrome de Miller-Dieker porque había recibido de la madre este cromosoma 17 sin su extremo distal telomérico del brazo corto, es decir, era monosómica para esta región distal telomérica.

En otra familia con un paciente con síndrome de Miller-Dieker y cariotipo aparentemente normal, se descubrió en el padre mediante técnicas FISH, una translocación críptica 8q;17p. El hijo afectado recibió del padre el cromosoma 17 sin su extremo normal telomérico¹⁷.

Translocaciones crípticas también han sido descritas en pacientes con síndrome de maullido de gato¹⁸ y en pacientes con síndrome de Wolf-Hirschhorn¹⁹.

Vale la pena señalar que los telómeros de los cromosomas contienen la secuencia TTAGGG que se repite de varios cientos a miles de veces y que estas secuencias repetidas facilitarían la asociación término-terminal entre cromosomas no homólogos, lo que a su vez favorecería la producción de estas translocaciones crípticas²⁰. No hace falta hacer énfasis en la gran utilidad de las técnicas de FISH en el estudio de parejas con aborto habitual, en quienes se sospeche una alteración citogenética, pero las técnicas de bandas sean aparentemente normales; y en el estudio de pacientes con retardo mental de origen desconocido, particularmente cuando el fenotipo de los afectados es diferente en la misma familia.

Revisen tal interés estos estudios que recientemente se ha propuesto el análisis de la integridad telomérica mediante múltiples técnicas combinatorias de tinción FISH e imágenes digitales computarizadas que permitan el estudio simultáneo de todos los telómeros de los cromosomas humanos¹⁰.

La otra contribución importante de la citogenética ha sido el establecimiento de alteraciones cromosómicas útiles en el diagnóstico y el pronóstico de las leucemias y los tumores sólidos²¹. Este campo ha desembocado en el descubrimiento de los oncogenes y de los genes supresores²².

Se han descrito numerosos rearrreglos cromosómicos en las neoplasias, principalmente del tipo de la translocación o de la deleción. Así por ejemplo, se conocen muy bien y se han diseccionado minuciosamente a nivel molecular la translocación 8;14 en el linfoma de Burkitt que compromete el oncogen *c-myc*²³, y la translocación del cromosoma Philadelphia en la leucemia mieloide crónica que involucra el oncogen *c-abl* en el rearrreglo 9;22²⁴.

Recientemente, mediante técnicas de FISH ha sido posible identificar la amplificación *in situ* de diferentes oncogenes en distintas neoplasias. Así por ejemplo, mediante la técnica de la hibridación genómica comparativa (HGC)²⁵ se ha hecho el análisis citomolecular en los tumores sólidos y se ha demostrado la amplificación *in situ* de secuencias oncogénicas, tales como *c-myc* en cáncer colorectal y en cáncer de mama; *N-myc* en neuroblastoma y en carcinoma de células pequeñas del pulmón; y *erbB2* en cáncer de seno y en carcinoma de células pequeñas del pulmón.

La asociación de múltiples técnicas combinatorias de hibridación genómica comparativa e imágenes digitales computarizadas permitirán el estudio simultáneo de amplificaciones de distintos oncogenes, lo cual tiene invaluables aplicaciones para establecer el diagnóstico y el pronóstico en las neoplasias.

Referencias

- Nathans D, Smith HO. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Ann Rev Biochem*. 1975;44: 273-296 .
- Mullis KB. The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific Amer* 1990;262: 43-46.
- Salamanca F. Citogenética Humana. Fundamentos y Aplicaciones Clínicas. Editorial Médica Panamericana, México D.F. 1990.
- Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Seagraves R, Lucas J, Gray J. Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome specific libraries; detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85: 9138-9142.
- Salamanca F. Desarrollo de la genética mendeliana y de la citogenética en el presente siglo. *Gac Méd Méx* 1985;121: 111-127.
- Salamanca F, Guzman M, Barbosa E, Martínez I. A new fluorescent compound for cytogenetic studies. *Ann Genet* 1972;15: 127-133.
- Lichter P, Cremer T, Borden J, Mannelidis L, Ward DC. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by *in situ* suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 1988;80: 224-234.
- Klinger K, Landes G, Shook D, Harvey R, Lopez L, Locke P et al. Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Am J Hum Genet* 1992;51: 55-65 .
- Kuo WL, Tenjin H, Seagraves R, Pinkel D, Golbus MS, Gray J. Detection of aneuploidy involving chromosomes 13, 18, or 21, by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to interphase and metaphase amniocytes. *Am J Hum Genet* 1991;49: 112-119.
- Ledbetter DH. Cryptic translocations and telomere integrity. *Am J Hum Genet* 1992;51: 451-456 .
- Fantes JA, Bickmore WA, Fletcher JM, Ballesta F, Hanson IM, van Heyningen V. Submicroscopic deletions at the WAGR locus, revealed by nonradiative *in situ* hybridization. *Am J Hum Genet* 1992;51: 1286- 1294.
- Scott A, Phillips J, Migeon B. DNA restriction endonuclease analysis for localization of human beta and delta-globin genes on chromosome 11. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76: 4563-4569.
- Kan YW, Dozy A, Trecartin R, Todd D. Identification of a nondeletion defect in alpha-thalassemia. *New Engl J Med* 1977;297: 1081-1087.
- Lamb J, Harris PC, Lindenbaum RH, Reeders ST, Wilkie AOM, Buckle VJ et al. Detection of breakpoints in submicroscopic chromosomal translocation, illustrating an important mechanism for genetic disease. *Lancet* 1989; 2: 819-824 .
- Miller JO. Lissencephaly in two siblings. *Neurology* 1963;13: 841-850.

16. Dieker H, Edwards RH, ZuRhein G, Chou SM, Hartman HA, Opitz JM. The lissencephaly syndrome. The Clinical Delineation of Birth Defects. National Foundation March of Dimes, New York, 1969; pp.53-64.
17. Kuwano A, Ledbetter SA, Dobyns WB, Emanuel BS, Ledbetter DH. Detection of deletions and cryptic translocations in Miller-Dieker syndrome by *in situ* hybridization. Am J Hum Genet 1991;49: 707-714.
18. Overhauser J, Bengtsson U, McMahon J, Ulm J, Butler MG, Wasmuth JJ. Prenatal diagnosis and carrier detection of a cryptic translocation by using DNA markers from the short of chromosome 5. Am J Hum Genet 1989;45: 296-303.
19. Altherr MR, Bengtsson U, Elder FFB, Ledbetter DH, Wasmuth JJ, McDonald ME, Gusella JF, et al. Molecular confirmation of Wolf Hirschhorn syndrome with a subtle translocation of chromosome 4. Am J Hum Genet 1991;49: 1235-1242.
20. Prown WRA, MacKinnon PJ, Villasante A, Spurr N, Buckle VJ, Dobson MJ. Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. Cell 1990;63: 119-132.
21. Salamanca F. Genética y Cáncer. Citogenética y Cáncer. Gac Med Mex. 1992;128: 110-117.
22. Stanbridge E. Human tumor suppressive genes. Annu Rev Genet 1990;24: 615-657.
23. Klein G, Klein E. Conditioned tumorigenicity of activated oncogenes. Cancer Res. 1986;46: 3211-3216.
24. DeKlein A, VanKessel A, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. Nature 1982;300: 765-778.
25. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science 1992;258: 818-821.

V. Actualidades de la genética molecular en enfermedades mitocondriales

SALVADOR ARMENDARES S

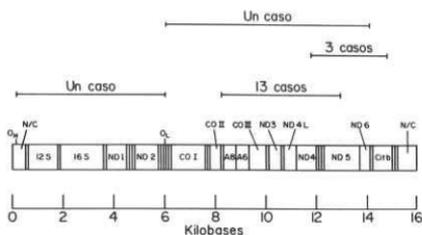
Estructura y función del ADNmt

La biología molecular ha sido muy útil para el estudio y conocimiento del ADN mitocondrial (ADNmt).

Ese ácido nucleico se encuentra en las mitocondrias localizadas en el citoplasma de las células, es autorreplicable y codifica para una serie de proteínas y otros elementos¹. Su estructura (Fig.1) es la de una pequeña doble hélice de sólo 16,596 pares de bases, su forma es circular y contiene

genes para la síntesis de 22 ARN de transferencia, para dos tipos de ARN ribosomal necesarios para la síntesis de proteínas mitocondriales y para 13 péptidos que son subunidades de los diferentes pasos de la fosforilación oxidativa celular que es el proceso generador de energía. Las cadenas del ADNmt tienen una distribución asimétrica de la guanina y de la citosina lo que da lugar a una cadena pesada rica en guanina, y otra ligera en la que predomina la citosina.

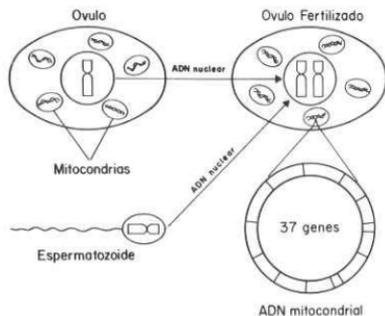
Mapa lineal del ADN_{mt} mostrando los loci de sus 37 genes



A=ATPasa; CO=Citocromo oxidasa; Cytb=Citocromo b; ND=NADH-coenzima Q reductasa
 O_H, O_L=Origen de la replicación de cadenas H y L; I2 S, I6 S=ARNr;
 N/C=Región no codificadora; ▭=ARNt

Al parecer el ADNmt codifica solamente para algunas proteínas mitocondriales, mientras que las enzimas implicadas en su replicación, transcripción y traducción son codificadas por genes que se encuentran en el ADN del núcleo de la célula. Se conoce ya la localización de los genes del ADNmt, y la secuencia de éstos muestra una economía extremada de la organización genética, pues los genes tienen entre sí muy pocas o ninguna de las secuencias codificadoras (intrones).

Hay dos características además de las mencionadas, que le confieren al ADNmt del hombre un particular interés, a saber: 1.- Como las mitocondrias se encuentran en el citoplasma y los espermatozoides prácticamente carecen de éste, el genoma mitocondrial es íntegro y directamente heredado del óvulo. Es una herencia, para fines prácticos, exclusivamente materna (Fig. 2). 2.- El ADNmt tiene una tasa de mutación de cinco a diez veces mayor que la del ADN del núcleo² lo que ha determinado que haya una alta frecuencia de sitios polimórficos con la consiguiente diversidad en los "fragmentos de restricción de tamaño variable" los cuales, como se ha observado, se correlacionan con el origen étnico y geográfico de los individuos que constituyen diversas poblaciones actuales³. Esas propiedades hacen que el análisis del ADNmt sea muy atractivo y sobre todo muy adecuado para las investigaciones antropológicas y médicas.



El ADNmt y el origen del hombre

Hace más o menos cinco años el estudio del ADNmt⁴ dió lugar a un sonado debate, el cual todavía persiste, acerca del origen del hombre moderno^{5,11} al proponerse la existencia de una "Eva africana" que hubiere vivido hace unos 200,000 años en algún lugar del continente africano. Posteriormente¹ se apreció que la filogenia de los diferentes tipos de ADNmt encontrados en otras 10 poblaciones sugería que todos los tipos de ADNmt podrían haberse originado de un tipo de ADNmt ancestral único y común. La distribución de los tipos de ADNmt compartidos por los diferentes grupos continentales, indican que las poblaciones caucásicas pueden haber sido las más cercanas a una población ancestral a partir de la cual, todos los otros grupos continentales podrían haberse diversificado. La filogenia parcial de los tipos de ADNmt observados en otras cinco poblaciones, también mostró que el mito de un romántico Edén africano se basó, aparentemente, en un "árbol genealógico" incorrecto de los diferentes tipos de ADNmt encontrados³.

El ADNmt y la medicina

Aunque ya hace casi 25 años que Nass¹² describió el ADNmt, ha sido hasta hace muy poco, gracias a la biología molecular, que se ha reconocido el papel que juega en la etiología de algunas enfermedades.

Si bien es verdad que la mayor parte de las enfermedades de origen genético, son debidas a anomalías de los genes que se encuentran en los cromosomas nucleares, cada vez hay más evidencia de que algunos padecimientos hereditarios son causados por genes que están en el ADNmt. En efecto, hace apenas unos cuatro o cinco años se correlacionó¹³ a la neuropatía óptica hereditaria de Leber con un cambio único (mutación de "punto") en una base del

ADNmt. Esta enfermedad se manifiesta clínicamente por degeneración del nervio óptico y pérdida repentina e irreversible de la vista en la edad adulta temprana. Como causa de la enfermedad se han identificado actualmente dos mutaciones de "punto" en los genes mitocondriales que participan en la fosforilación oxidativa de las células.

Otro hecho importante y quizás más sorprendente, ha sido el descubrimiento^{14,19} de que el ADNmt de algunos músculos de enfermos con ciertas encefalomiopatías tienen "deleciones" o pérdidas importantes de material genético.

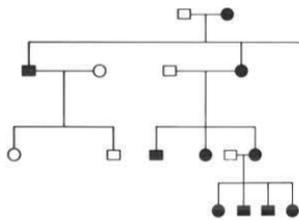
Holt et al. en 1990²⁰ mostraron que el principio molecular de una nueva enfermedad mitocondrial reside en la sustitución de una sola base, de la leucina por arginina. Esta enfermedad se caracteriza por retinitis pigmentosa, ataxia, convulsiones, demencia y debilidad de los músculos proximales.

En términos generales se puede decir que las mutaciones patogénicas del ADNmt se asocian con un amplio espectro de enfermedades degenerativas crónicas y que esas mutaciones pueden ser de dos tipos: 1.- Por sustitución de una sola base por otra (mutaciones de "punto") como en la enfermedad de Leber y en este caso el defecto es generalizado. 2.- Por "deleciones" o por duplicaciones del material genético mitocondrial como en las diferentes variantes de las miopatías, en cuyo caso están solamente afectados algunos tejidos o algunas de las células de éstos.

Ahora bien, las enfermedades monogénicas determinadas por mutaciones de los genes incluidos en el ADN del núcleo, tienen características de transmisión hereditaria bien definidas y se manifiestan en los árboles genealógicos con claridad y simplicidad. Pero ¿cómo reconoceremos a las enfermedades que son dadas por mutaciones en el ADNmt? cada uno de nosotros, como ya se ha dicho, recibimos el ADNmt de nuestra madre, una enfermedad de ese tipo siempre se heredará por linaje materno pero a diferencia de la herencia recesiva ligada al cromosoma X, en que la madre es la portadora y sólo sus hijos varones están afectados, estarán afectados tanto los hijos como las hijas. En las generaciones subsecuentes se observará que la enfermedad se comporta como si fuera un rasgo autosómico dominante, con enfermos en todas las generaciones (herencia de tipo vertical), pero con un número mucho mayor de individuos afectados en cada generación de lo que se acostumbra a ver en la herencia autosómica dominante (Fig 3).

No obstante, no es fácil precisar que una enfermedad es de origen mitocondrial ya que hay muchos factores que complican y dificultan su identificación. En efecto, como hay múltiples copias del ADNmt en cada célula, el fenotipo del individuo dependerá de las proporciones relativas entre

el gen mutado y el gen cimarrón -o sea el gen más común, también llamado silvestre como traducción literal del inglés "wild type"- en los genomas mitocondriales en las células de un tejido en particular. El efecto fenotípico es más manifiesto en las células que contienen sólo el ADNmt mutado, células a las que se les llama "homoplásmicas". En las células "heteroplásmicas", es decir, las que tienen mezcla del ADNmt mutado y del no mutado, se observa una amplia variación en la expresión fenotípica. Es por eso que en las miopatías mitocondriales la patología puede localizarse sólo en algunos músculos y que las mujeres afectadas pueden tener hijos(as) sanos si sus células gonadales se encuentran indemnes. Otra complicación para la identificación de esas miopatías, se debe a que en las divisiones mitóticas de las células la proporción entre el ADNmt mutado y el cimarrón puede cambiar y a ese fenómeno se le llama "segregación mitótica".



Pedigrée de una familia con una enfermedad mitocondrial

Todas esas complejidades en la correlación del fenotipo y el genotipo hacen particularmente difícil el manejo médico de esos pacientes y el asesoramiento genético de los familiares. El diagnóstico y atención de ese tipo de enfermos debe basarse en seis elementos²¹: 1.- Evaluación clínica. 2.- Análisis del *pedigrée*. 3.- Pruebas metabólicas. 4.- Estudios enzimáticos de la función de la fosforilación oxidativa de los músculos esqueléticos. 5.- Histoquímica y microscopía electrónica de los músculos esqueléticos. 6.- Análisis de la mutación del ADNmt en los tejidos apropiados.

En la práctica, en muchos de los enfermos la evaluación clínica, el análisis del *pedigrée* y las pruebas metabólicas, son suficientes para identificar los fenotipos asociados con mutaciones específicas del ADNmt. En la mayor parte de las mutaciones de "punto" del ADNmt, éstas pueden identificarse con el análisis de las células de la sangre y éste

puede hacerse extensivo a los parientes maternos. En cambio en la mayoría de las "deleciones" del ADNmt esas no pueden detectarse en las células de la sangre y es necesario recurrir a la biopsia de músculo para efectuar los estudios histoquímicos, enzimáticos y de microscopía electrónica.

Referencias

- Anderson S, Bankier AT, Barrell AG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 1981;290:457-465.
- Brown WM, George M Jr, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979;76:1967-1971.
- Excoffier L, Langany A. Origin and differentiation of human mitochondrial DNA. *Am. J. Hum. Genet* 1989;44:73-85.
- Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, 1987;325: 31-36.
- Darlu P, Tassy P. Disputed African origin of human populations. *Nature*, 1987;329: 111.
- Darlu P, Tassy P. L'ADN, l'Afrique et l'homme. *La Rech.*, 1987;18: 979-981.
- Darlu P, Tassy P. Roots (a comment on the evolution of human mitochondrial DNA and the origin of modern humans). *Hum. Evol.*, 1987;2: 407-412.
- Eckhardt RB. Evolution east of Eden. *Nature*, 1987;326: 749.
- Poulton J. All about Eve. *New Sci.*, 1987;1640: 51-53.
- Saitou N, Omoto K. Time and place of human origin from mtDNA data. *Nature*, 1987;327: 288.
- Wainscoat JS, Hill VS, Boyce AL, et al. Evolutionary relationship of human populations from an analysis of nuclear DNA polymorphism. *Nature*, 1986;319: 491-493.
- Nass MMK. Mitochondrial DNA: advances, problems and goals. *Science*, 1969;165 25-28.
- Wallace DC, Singh S, Lott MT, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, 1988;242:1427-1430.
- Holt JJ, Cooper J, Morgan-Hughes JA, et al. Deletions of muscle mitochondrial DNA. *Lancet*, 1988;1: 1462.
- Holt JJ, Harding AE, Petty RKH, et al. Deletion of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*, 1988;331: 717-719.
- Lestienne P, Ponsot G. Kearns-Sayre syndrome with muscle mitochondrial DNA deletions. *Lancet*, 1988;1: 885.
- Ozawa T, Yoneda M, Tanaka M, et al. Maternal inheritance of deleted mitochondrial DNA in a family with mitochondrial myopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988;154: 1240-1247.
- Rotig A, Colonna M, Blanche S, et al. Deletion of blood mitochondrial DNA in pancytopenia. *Lancet*, 1988;2:567568.
- Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, et al. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology*, 1988;38: 1339-1346.

20. Holt IJ, Harding AE, Petty RKII, et al. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am. J. Hum. Genet.*, 1990;46: 428-433.
21. Shoffner JM, Wallace DC. Mitochondrial genetics: Principles and Practice. *Am.J. Hum. Genet.*, 1992;51: 1179-1186.

VI. El proyecto del genoma humano

RUBEN LISKER*

El antecedente histórico del proyecto del genoma humano, se remonta a una reunión científica que tuvo lugar en Alta, Utah del 9 al 13 de diciembre de 1984¹. Alta está situada en las montañas Saguache, es una zona recreativa para la práctica de deportes invernales y se puede decir que en la fecha señalada fue también la capital de la genética humana. La reunión fue patrocinada por el Departamento de Energía de los EU y la Comisión Internacional para la Protección contra Mutágenos y Carcinógenos Ambientales. Su propósito era preguntar a los investigadores líderes en métodos analíticos del ácido desoxirribonucleico (ADN) si creían poder identificar un aumento en la frecuencia de mutaciones en los sobrevivientes de las explosiones atómicas de Hiroshima y Nagasaki. La principal conclusión fue que la metodología existente no era suficientemente sensible. Los participantes tenían antecedentes científicos diversos y muchos no se conocían entre sí. Sin embargo el intercambio de opiniones e ideas fue tan vigoroso y estimulante que, si el proyecto del genoma humano resulta ser trascendente para la biología, los historiadores reconocerán a la reunión de Alta como la generadora de dicho proyecto.

El genoma de un organismo es la suma de todo el material genético presente en una sola célula. Este material genético es el ADN y cada una de las 3 billones de células de un individuo, con algunas excepciones, contienen exactamente el mismo complemento de ADN. El proyecto del genoma humano es un esfuerzo internacional que tiene como objetivos principales: 1) averiguar el lugar cromosómico ocupado por los 50,000 a 100,000 genes que supuesta-

mente tiene cada miembro de nuestra especie; y 2) conocer la secuencia de los 3,000,000,000 de pares de bases del genoma humano. Se espera que esta información sea fundamental para la ciencia biomédica del siglo XXI y que beneficie enormemente a la medicina. De entrada ayudará a entender y a tratar a las más de 4,000 enfermedades hereditarias mendelianas simples y a las multifactoriales en que el factor genético es importante, recordando que algunos de estos padecimientos como la hipertensión arterial y la diabetes mellitus son muy frecuentes en la población.

Las metas científicas para el período 1991-1995 son: 1) construir mapas y "secuenciar" el genoma humano; 2) construir mapas y secuenciar el ADN de otros organismos; 3) desarrollar las bases de datos y forma de utilizarlas; 4) discutir los aspectos éticos, legales y sociales del proyecto; 5) formar investigadores en el área; 6) propiciar el desarrollo tecnológico; y 7) transferir las tecnologías.

1. *Construir mapas y obtener secuencias de ADN humano.* Secuenciar, en este contexto, es investigar el orden de nucleótidos en una molécula de ADN. Existen dos tipos de mapas, el genético y el físico. El mapa genético se construye averiguando la frecuencia con que dos genes se heredan juntos. La base del procedimiento, es que los genes situados CERCA en un mismo cromosoma, se heredan (transmiten) juntos con mayor frecuencia que los que están LEJOS o en distintos cromosomas. La distancia se mide en unidades llamadas centimorgans, y dos genes están separados por uno centimorgan cuando se separan uno por ciento de las veces durante su transmisión de padres a hijos, o sea que en el 99% de las ocasiones se transmiten juntos.

Estudios de este tipo se han realizado desde hace 50 años y generalmente se investiga el gen que produce alguna enfermedad y el de algún marcador genético como los grupos sanguíneos. En la actualidad con el descubrimiento de los RFLPs (del inglés *restriction fragment length polymorphisms*) que están distribuidos a lo largo de todos los cromosomas, se ha aumentado mucho la eficiencia del procedimiento. En 1990 de 4937 genes conocidos, 2281 seguros y 2656 probables, se conocía la ubicación cromosómica de 1718 de ellos, algo más de la mitad con absoluta certeza y los demás de manera tentativa.

Las distancias entre los genes en los mapas físicos, se miden en unidades físicas, como número de nucleótidos. El más antiguo es el mapa citogenético que relaciona la posición de los genes con sitios visibles de los cromosomas, como el centrómero o las diferentes bandas producidas por tinciones especiales. Su resolución es muy baja ya que cada banda puede incluir hasta 10 millones de bases. El tipo moderno de mapa físico está integrado por una colección de clonas de ADN de preferencia sobrepuestas, llamadas

* Departamento de Genética y Subdirección de Investigación, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Tlalpan, D. F. México.

contigs, y es el material que se está usando para estudiar las secuencias de bases. Un problema de los *contigs* es que son relativamente pequeños, alrededor de 240,000 bases, y sería ideal que fueran mayores, del orden de 2,000,000 de bases, lo que se está logrando con éxito por un grupo de Francia, que labora en el Centro de Estudios de Polimorfismos Humanos y que aparentemente, en el presente año terminará el primer mapa completo del genoma humano que, aunque burdo, permitirá avanzar con mayor rapidez en la elaboración de un mapa más preciso. Para poner el problema en perspectiva, baste decir que la secuencia de nucleótidos más grande publicada a la fecha, es la del virus de Epstein-Barr que tiene 170,000 pares de bases. Se está intentando obtener la secuencia del ADN de algunas bacterias con un tamaño aproximado de 4.5 millones de bases y la suma de las diversas secuencias publicadas del genoma humano llega a 5,000,000 de pares de bases. Sin embargo, el total a secuenciar es de 3,000,000,000 de bases, 600 veces más que lo que hasta ahora se ha logrado en nuestra especie. Es indudable que para realizar esta meta va a ser necesario automatizar el procedimiento y abaratar el costo, que en la actualidad es de 2 a 5 dólares por base, en laboratorios que lo hacen de rutina y debe bajar a 50 centavos de dólar por base para que sea práctico y razonable hacer el estudio.

2. *Construir mapas y obtener secuencias de ADN de otros organismos.* Dado que la experiencia ha enseñado que la investigación de otros organismos proporciona información importante para interpretar datos de los estudios en humanos, el proyecto auspiciará investigaciones en otras especies como *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y el ratón de laboratorio.

3. *Desarrollar la informática.* El producto del proyecto del genoma humano serán mapas genéticos y secuencias de nucleótidos. Será crítico desarrollar un sistema de información computarizado para la colección, almacenamiento, análisis y distribución de la gran cantidad de datos por generarse. Los Institutos Nacionales de Salud y el Departamento de Energía de los EU crearon un grupo de trabajo avocado a desarrollar lo necesario para operar este proyecto.

4. *Consideraciones éticas, legales y sociales.* En relación a las consideraciones éticas, legales y sociales, el proyecto se realiza bajo la creencia de que sus resultados beneficiarán mucho a la humanidad. Sin embargo, como cualquier otra tecnología nueva, plantea situaciones que deben analizarse con cuidado. Algunas preguntas que no son nuevas, pero sí se van a discutir con mucha frecuencia son, ¿puede divulgarse a terceros la información sobre la

estructura genética de algún individuo?, ¿cómo se asegura que la información no lleve a discriminación o estigmatización en áreas como empleo y seguros? dado que habrá un lapso prolongado entre nuestra capacidad de diagnosticar una enfermedad y la de tratarla ¿cómo manejaría un sujeto el conocer un diagnóstico grave varios años antes de que se manifieste una enfermedad, para la que no hay tratamiento? Para contestar estas preguntas es necesario discutir ampliamente los problemas, propiciando reuniones específicas e invitando a la participación activa de la comunidad. Debe financiarse el desarrollo de material didáctico y buscar una amplia colaboración internacional. UNESCO ha auspiciado esto último habiéndose realizado dos reuniones en Valencia, España, una en 1990 y otra en 1991. En otros países también han tenido lugar reuniones sobre el particular.

5. *Formación de investigadores.* El proyecto requiere de un número considerable de personas, que tengan los conocimientos y habilidades necesarias. Se requieren genetistas, biólogos moleculares o investigadores de otros campos, como la física, la química, la ingeniería, las matemáticas y la computación. Serían muy útiles los científicos con habilidades multidisciplinarias, personas que entiendan los problemas biológicos y busquen soluciones utilizando conocimientos de otros campos. Para lograr estos objetivos se ha decidido otorgar becas a nivel de pre y postgrado para facilitar la formación de investigadores. En Latinoamérica el Programa Latinoamericano del Genoma Humano (PLAGH) auspiciado por la UNESCO y otros organismos, ha desarrollado varios cursos breves sobre diversos aspectos de biología molecular, al igual que dos simposios de mayor envergadura. En México se celebró en febrero de 1992, en la Unidad de Investigación del IMMS de Guadalajara, el curso llamado: "Reacción en cadena de la polimerasa y sus aplicaciones en el estudio del genoma humano" y en mayo próximo tendrá lugar en la ciudad de México primero, y en Oaxtepec después, un simposio internacional sobre el genoma humano en el que intervendrán, además de expertos extranjeros, representantes de todos los grupos nacionales que ya están haciendo estudios de biología molecular en padecimientos genéticos. Uno de los objetivos es actualizar la información y propiciar trabajos de investigación colaborativos entre los diferentes participantes.

6. *Desarrollo tecnológico.* Se requiere de innovaciones tecnológicas para disminuir costos y automatizar el trabajo rutinario. El proyecto financiará proyectos de automatización, optimización y reducción de costos en tecnologías ya existentes como clonación, robótica, secuenciación de ADN, tecnología de geles, desarrollo de

instrumentos, etc. También apoyará el desarrollo de tecnologías completamente novedosas, y por ello consideradas como de alto riesgo.

7. *Transferencia de tecnología.* La tecnología generada en el proyecto deberá transferirse con rapidez al sector industrial, para que pueda desarrollar productos de interés médico o para otras áreas productivas.

Financiamiento. Es de interés comentar brevemente la inversión que están realizando algunos países en este rubro. El proyecto norteamericano del genoma humano contó con 27.9, 46.7, 87.4 y 152.5 millones de dólares en 1988, 1989, 1990 y 1991 respectivamente y de 1992 a 1995 gastará 200 millones por año. El 45 a 55% de esa cantidad se destinó para estudios en humanos e informática, del 20 al 30% para estudios en otros organismos, y la misma cantidad para desarrollo de infraestructura. En Francia en 1990 gastaron 1.4 millones de dólares en investigación metodológica, 3.2 millones en el Centro de Estudios de Polimorfismos Huma-

nos y 6.0 millones para el desarrollo de robots. En 1991 gastaron 40 millones de dólares y planearon gastar 50 en 1992. En México no existe una inversión organizada específica para este proyecto, pero es obvia la simpatía y ayuda de las autoridades del sector salud, manifestada entre otras cosas, por su apoyo generoso al curso sobre reacción en cadena de la polimerasa y sus aplicaciones en el estudio del genoma humano, celebrado el año pasado en Guadalajara, y al simposio internacional sobre el genoma humano que se celebrará el próximo mes de mayo en el D.F. y Oaxtepec principalmente, aun cuando algunas actividades se realizarán también en Guadalajara y Monterrey.

Referencia

1. Cook-Deegan MR. The Alta Summit, December 1984. *Genomics* 1989;5:661-663.