

CURSO DE ACTUALIZACIÓN EN

GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

APLICADA AL SECTOR AGRÍCOLA



**GOBIERNO DE CHILE
FUNDACION PARA LA
INNOVACION AGRARIA**



SANTIAGO, 16 AL 21 DE ENERO DE 2006

Programa

“CURSO DE ACTUALIZACIÓN EN GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA”

Lunes 16

Modulo Teórico (9:00 a 13:00 hr)

- Prueba de diagnóstico (Profesora Mariña Gambardella)
- Biología del Núcleo Celular (Profesora Soledad Berríos)

Modulo Práctico (14:30 a 18:00 hr)

- Uso de multimedia para el aprendizaje de la genética. (Profesor Manuel Santos)

Martes 17

Modulo Teórico (9:00 a 13:00 hr)

- Reproducción (Profesora Soledad Berríos)
- Genes y medioambiente (Profesora Laura Walker)

Modulo Práctico (14:30 a 18:00 hr)

- Extracción de ADN, PCR y marcadores moleculares. (Profesores Cecilia Baginsky y Cristián Araneda)

Miércoles 18

Modulo Teórico (9:00 a 13:00 hr)

- Genes y medioambiente continuación (Profesora Laura Walker)
- Tamaño, Organización y estructura del genoma. (Profesora Laura Walker)

Modulo Práctico (14:30 a 18:00 hr)

- Tamaño, Organización y estructura del genoma. (Profesora Laura Walker)

Jueves 19

Modulo Teórico (9:00 a 13:00 hr)

- Herramientas Biotecnológicas en la Producción Agrícola (Profesora Marina Gambardella)

Modulo Práctico (14:30 a 18:00 hr)

- Microarreglos (Profesora Marina Gambardella)

Vienes 20

Modulo Teórico (9:00 a 13:00 hr)

- Avances en Genética Humana (Profesor Manuel Santos)

Modulo Práctico (14:30 a 18:00 hr)

- Visita a laboratorios de biotecnología (Profesora Marina Gambardella)

Sabado 21

Modulo Teórico (9:00 a 13:00 hr)

- Examen Escrito (Profesora Marina Gambardella)

Participantes Curso “Actualización en Genética y Biotecnología”

1. Alejandra Ángel Véliz shorty308_alita@hotmail.com
2. Mónica Araya Espiñeira claufran101@hotmail.com
3. Luis Bravo Chorcho lubravo@uchile.cl
4. Cristian Calisto Frías ccalisto@surnet.cl
5. Alejandro Delgado Tapia alisdeta@hotmail.com
6. María Díaz Jiménez
7. María Inés Figueroa Toro mainesfi@vtr.net
8. Mauricio García Montecinos mgarcia_montecinos@yahoo.es
9. Lina Mangili Fernández lina_mangili@yahoo.es
10. Rodhe Moncada Muñoz rodhemoncada@gmail.com
11. Ximena Miranda Cruz ximena_mirandacruz@yahoo.com
12. Katia Ochoa Valenzuela katiaochoa@hotmail.com
13. Elba Pinto Figueroa elbamyriam@hotmail.com
14. Nelson Sendra Delgado sendrade@gmail.com
15. Emery Tapia Montenegro emerymagda@yahoo.es
16. Carolina Torres Armijo caroltorres3@gmail.com
17. Maureen Yissi González rectoria@theangels.cl

Material Complementario

Clase

Lunes 16 de Enero de 2006

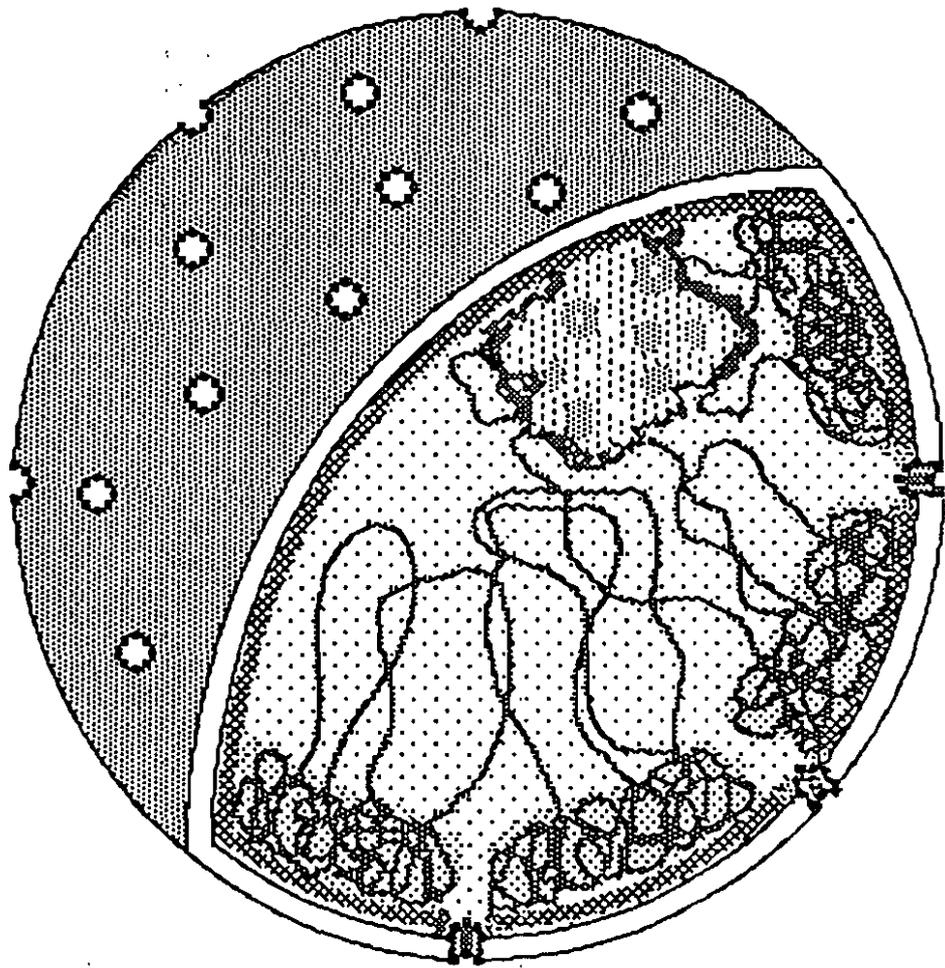
“NÚCLEO Y CROMATINA”

Profesora: SOLEDAD BERRIOS

Sole

CIENTIFICA BASICA

BIOLOGIA DEL NUCLEO CELULAR



Biología del núcleo celular

PREFACIO

El propósito de este fascículo es analizar la estructura y fisiología del núcleo celular, integrando en forma actualizada el conocimiento científico alcanzado en este tema. La célula es una unidad estructural y funcional, en la cual todos sus compartimientos, separados o no por membranas biológicas, están estrechamente integrados y coordinados en sus funciones específicas. Por ello no es extraño que el estudio del compartimiento nuclear nos lleve necesariamente hacia otros compartimientos celulares, con los cuales el núcleo mantiene múltiples interacciones funcionales. Entre éstas destaca por ejemplo, el que los estímulos extracelulares que motivan respuesta nuclear sean recibidos a través de vías citoplasmáticas y que, de la misma manera, las respuestas nucleares a tales estímulos se reflejen en cambios en la actividad de organelos citoplasmáticos.

Por otra parte, el núcleo es el compartimiento en el que las células eucariontes tienen organizado el material hereditario. De esta manera, será también materia de análisis la ultraestructura misma del núcleo, así como la del material hereditario que está contenido en él. Veremos como es posible hacer compatible una organización molecular constante del material hereditario con la multiplicidad de informaciones que contiene, y con la expresión regulada de ellas en el tiempo.

Las células pueden reproducirse y, de esta manera, perpetuarse en el tiempo. Esto es posible porque

existe un eficiente sistema de reproducción celular como es la mitosis, en el cual participa toda la célula y en el que el material hereditario, organizado en cromosomas, se distribuye ecuacionalmente en las células hijas. El estudio de los cromosomas, observados desde fines del siglo pasado a través del microscopio de luz, ha contribuido en mucho al entendimiento del sistema nuclear y genético de las células eucariontes. Así, otra parte del fascículo estará dedicada a la mitosis y, en particular, a la relación núcleo-cromatina y cromosomas.

El notable avance de la investigación científica, como ocurre con ciertos campos de la Biología, se debe en gran medida al extraordinario desarrollo tecnológico y de las metodologías de análisis, algunas de ellas de gran sofisticación. Esto nos puede acarrear el problema que, al no conocer las bondades o limitaciones de dichas metodologías, no podamos analizar críticamente los resultados que a través de ellas se han obtenido. Es por ello que serán también abordadas algunas de las metodologías utilizadas en la investigación en biología celular y, en particular, algunas que han sido aplicadas o desarrolladas para estudiar la organización del núcleo y el material hereditario.

Los autores esperamos que la síntesis que se entrega al lector, sirva los propósitos de divulgar algunos de los aspectos más importantes de la organización y funcionalidad del Núcleo Celular.

INTRODUCCION

Sistema nuclear eucarionte

El núcleo es una estructura celular generalmente única, aproximadamente esférica y de unos 7 μ m de diámetro. Su límite está definido por la envoltura nuclear, que es una estructura compuesta por dos unidades de membrana separadas entre sí por un espacio. En el interior del núcleo se encuentra el material genético o hereditario. Molecularmente, el material genético corresponde al DNA (ácido desoxirribonucleico), el cual se encuentra asociado en forma característica a proteínas básicas llamadas *histonas*, y formando parte de un agregado macromolecular conocido como *cromatina* (Figura 1). Utilizando el microscopio electrónico de transmisión es posible observar en el interior del núcleo a la cromatina en distintos estados de condensación, uno o más nucléolos y gránulos de ribonucleoproteínas (RNP) dispersos en la cromatina descondensada. Más adelante veremos que, subyacente a esta aparente monotonía nuclear, existe un bulleto mundo de síntesis y procesamiento de diferentes moléculas, las que no son otra cosa que la expresión del mensaje genético contenido en el núcleo.

No todas las células tienen un núcleo verdadero, organizado en los términos señalados. A estas células se las llama *procariontes*. La mayoría de los procariontes también tienen al DNA como material hereditario. Sin embargo, éste no se encuentra organizado en cromatina como en las células que poseen núcleo verdadero, o *eucariontes*. En los procariontes, el DNA es una molécula única, generalmente circular, que se encuentra concentrada en un sector de la célula que se conoce como nucleoide. El nucleoide de los procariontes no está rodeado por membranas. Supuestamente, la compleja organización del material hereditario de los eucariontes habría evolucionado hace unos dos mil millones de años a partir de sistemas procariontes primitivos.

Las células procariontes generalmente viven en forma independiente unas de otras. Sin embargo, también pueden agregarse entre sí generando asociaciones de diferente tipo, en las que no hay especialización celular. Por el contrario, en los sistemas celulares eucariontes es frecuente encontrar organismos multicelulares, compuestos por miles o millones de células, en las cuales las funciones vitales son de responsabilidad de poblaciones celulares especializadas. Esta especialización, o diferenciación celular, demanda al mismo tiempo una gran coordinación entre las células.

La especialización funcional no significa una reducción de la información genética de cada célula

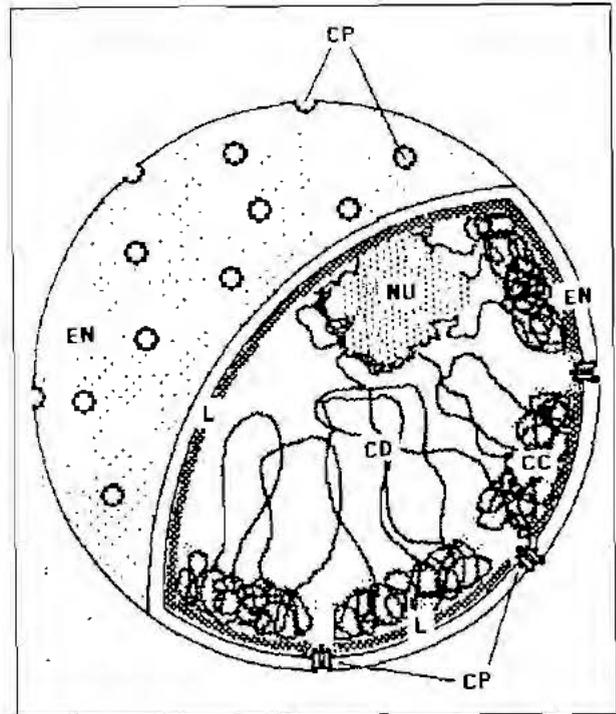


Figura 1. Estructura del núcleo. La envoltura nuclear (EN) limita al núcleo en toda su superficie externa. Formada por dos membranas que son atravesadas en varios puntos por complejos de poro (CP). En la periferia interna se encuentra cromatina condensada (CC), unida a la membrana nuclear interna a través de la lámina (L). Hacia el centro se observa cromatina descondensada (CD), y un nucléolo (NU).

diferenciada. Por el contrario, significa un aumento de la complejidad de la información, debido a las múltiples interacciones o regulaciones de su expresión que se hacen posibles y necesarias. En otras palabras, la aparición del sistema nuclear eucarionte en la evolución no sólo se tradujo en la presencia de un núcleo rodeado de membranas, sino también en la emergencia de un sistema genético más complejo, en el que la capacidad para organizar y regular la información resulta prácticamente insospechada.

La persistencia en el tiempo del sistema nuclear eucarionte se relaciona directamente con su heredabilidad, a través de la reproducción de células individuales o de organismos pluricelulares. Esto nos lleva a tener en cuenta que el sistema genético (y también el nuclear) tiene información no sólo para el metabolismo celular, sino también para su propia mantención y heredabilidad a través de las generaciones celulares.

Por otra parte, la complejidad alcanzada revela que dentro de ciertos rangos, el sistema nuclear eucarionte es un sistema abierto o permisivo a la varia-

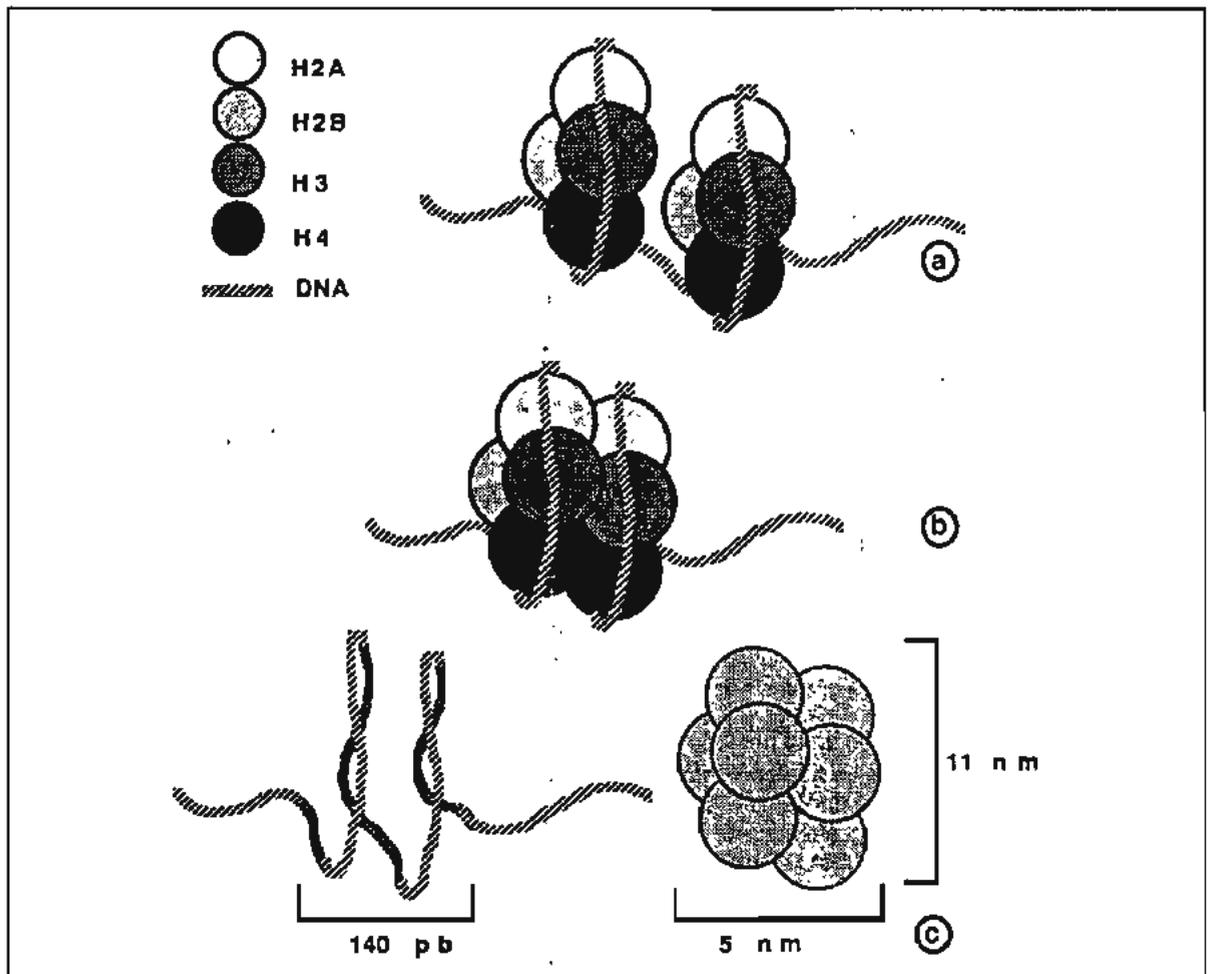


Figura 2. Estructura del nucleosoma. Esquema de las histonas H2A, H2B, H3, H4 y del DNA, elementos que conforman el nucleosoma. a) dos heminucleosomas, compuestos cada uno por un tetrámero de histonas H2A, H2B, H3 y H4 y un segmento de DNA. b) un nucleosoma, formado por dos tetrámeros de histonas H2A, H2B, H3 y H4, más un segmento de DNA de aproximadamente 140 pares de bases nucleotídicas (pb), enrollado sobre el cuerpo que conforman las histonas. c) El DNA se ha separado del cuerpo de histonas del nucleosoma. Se indican la longitud de 140 pares de bases nucleotídicas de DNA comprometidas en el nucleosoma, y las dimensiones del cuerpo ("core") del nucleosoma.

ción. Modificaciones génicas tanto estructurales como de expresión, debieron ocurrir en forma gradual, posibilitando la viabilidad de algunas de las células portadoras de dichos cambios. Tales modificaciones, incorporadas al sistema genético, se mantuvieron a través de las generaciones celulares o de organismos, llegando a sustituir a la alternativa genética original, o enriqueciendo las opciones del sistema genético.

MATERIAL HEREDITARIO

Cromatina

La cromatina fue descrita como una sustancia con características tintoriales propias, y que se en-

cuentra en el núcleo en reposo (interfásico). Estas primeras observaciones fueron realizadas a través del microscopio de luz sobre células teñidas con colorantes nucleares. Hoy en día, utilizando microscopios de luz de mayor poder resolutivo, no podemos ir mucho más allá de estas primeras descripciones. Así, podemos distinguir regiones nucleares de mayor densidad tintorial y otras, las más, de menor intensidad. Se sabe que las regiones más intensamente teñidas corresponden a *cromatina condensada*, y las de menor tinción, a *cromatina descondensada* (Figura 1). El microscopio electrónico de transmisión, con su poder de resolución mucho mayor, nos permite estudiar cortes muy finos de núcleos fijados, en los que es posible apreciar el ca-

rácter fibrilar de la cromatina. Estas fibras miden aproximadamente 30 nm de diámetro. En estas observaciones, la cromatina condensada se distingue de la descondensada por la mayor proximidad relativa entre las fibrillas de cromatina que, en su mayoría, aparecen seccionadas transversalmente. En la interfase no es posible distinguir individualmente a los cromosomas.

El método radioautográfico, de amplio uso en Biología Celular, ha permitido demostrar que las regiones de cromatina condensada son inactivas genéticamente, y que aquéllas de cromatina descondensada son muy activas. La actividad genética se manifiesta en la producción de RNA (ácido ribonucleico), moléculas de cadena simple que son sintetizadas por complementariedad de bases respecto de una de las cadenas del DNA. Al emplear nucleótidos que son exclusivos del RNA en síntesis, éste incorpora esos y otros nucleótidos, quedando globalmente marcado. Luego, las células son fijadas, tefidas y cubiertas con una emulsión fotográfica, la que posteriormente es revelada en forma semejante a como se haría con una exposición fotográfica corriente. En los sitios en que se encuentra localizado el RNA radioactivo, aparecerán marcas o granos oscuros, que revelarán así el origen de la emisión radioactiva. Mediante este método, se pudo observar la presencia de marcas radioautográficas en las zonas de cromatina descondensada y la ausencia de las mismas en las regiones de condensación cromatínica.

DNA e histonas

La cromatina está compuesta por DNA y proteínas histónicas. Estas moléculas se agregan entre sí en proporciones regulares, para conformar cuerpos semiesféricos conocidos como *nucleosomas*. Cada nucleosoma tiene aproximadamente 11 nm x 5 nm, y está constituido por dos tetrámeros de proteínas histónicas. Por sobre y entre las proteínas histónicas discurre DNA, de una longitud de 140 pares de bases nucleotídicas (Figura 2). Toda la cromatina está organizada en nucleosomas, de manera que la fibra básica de cromatina de 11 nm surge de la aposición ordenada de un nucleosoma con el nucleosoma siguiente que se encuentra a lo largo de la fibra.

Esta estructura de la cromatina fue reconocida mediante la observación en el microscopio electrónico de microesparcidos nucleares. Es decir, de cromatina extraída luego que los núcleos habían sido reventados en soluciones salinas de baja fuerza iónica. Con este método, junto con obtenerse cromatina fibrilar no seccionada, se extrajo también una de las proteínas histónicas más solubles, la histona

H1. Actualmente se sabe que la histona H1 participa en la unión de un nucleosoma con el siguiente, de modo que su extracción produce la separación de los nucleosomas, los que quedan unidos entre sí sólo por segmentos de longitud variable de DNA desprovistos de proteínas (Figura 3a).

Las histonas son proteínas de carácter básico, lo que les confiere una alta afinidad por el DNA. Son de bajo peso molecular y están compuestas en un alto porcentaje por los aminoácidos básicos arginina o lisina (Tabla 1). Cada tetrámero del cuerpo ("core") del nucleosoma está compuesto por las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Figura 2a). Cada una de estas histonas en realidad representa una verdadera familia de histonas, reconociéndose en la actualidad una familia H2A, una H2B y así sucesivamente. Habiéndose analizado en diversas especies animales y vegetales la secuencia de aminoácidos que componen cada una de estas familias de proteínas, se ha encontrado un extraordinario conservantismo en ellas, a pesar de la distancia filogenética entre algunos de los organismos estudiados.

Si bien las secuencias de aminoácidos de las histonas de cada familia son prácticamente equivalentes, aquéllas pueden presentar diversas propiedades químicas, debido a la presencia de diferentes radicales químicos unidos a sus aminoácidos. Aparentemente, estas modificaciones confieren a las histonas la plasticidad necesaria para permitir la expresión variable del mensaje genético contenido en el DNA, tanto en células poco diferenciadas como en células muy diferenciadas. Aparte de las clásicas histonas nucleosomales, otras dos proteínas histónicas, llamadas H5 y H6, han sido encontradas en la cromatina altamente condensada de núcleos de eritrocitos de pollo y en la cromatina de espermatozoides, respectivamente.

Fibra nucleosómica

La fibra básica de cromatina, o fibra nucleosómica, está presente tanto en la cromatina conden-

Tabla 1
CARACTERISTICAS DE LAS CINCO CLASES
PRINCIPALES DE HISTONAS

Histona	PM	Lisina % molar	Arginina % molar	Aminoácidos básicos/ácidos	Aminoácidos totales
H1	21.000	24,8	2,6	5,90	216
H2A	13.960	10,9	9,3	1,50	129
H2B	13.700	16,0	6,4	1,93	125
H3	15.273	9,6	13,3	1,65	135
H4	11.236	10,8	13,7	2,45	102

Ref.: Berkeleoff, Bourguet, Favard y Lacroix: *Biología y Fisiología Celular* IV, Editorial Omega 1984

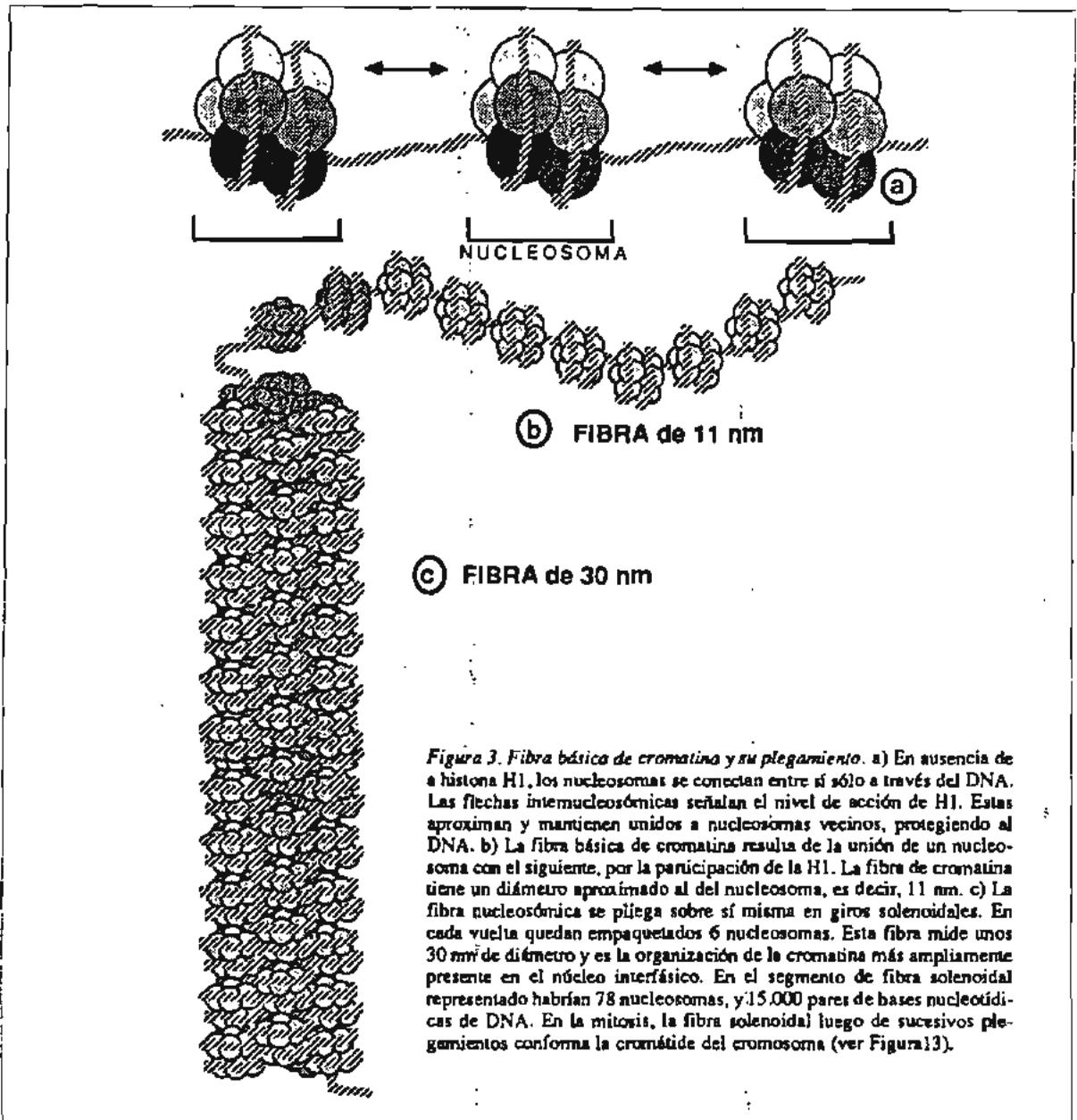


Figura 3. Fibra básica de cromatina y su plegamiento. a) En ausencia de la histona H1, los nucleosomas se conectan entre sí sólo a través del DNA. Las flechas internucleosómicas señalan el nivel de acción de H1. Estas aproximan y mantienen unidos a nucleosomas vecinos, protegiendo al DNA. b) La fibra básica de cromatina resulta de la unión de un nucleosoma con el siguiente, por la participación de la H1. La fibra de cromatina tiene un diámetro aproximado al del nucleosoma, es decir, 11 nm. c) La fibra nucleosómica se pliega sobre sí misma en giros solenoidales. En cada vuelta quedan empaquetados 6 nucleosomas. Esta fibra mide unos 30 nm de diámetro y es la organización de la cromatina más ampliamente presente en el núcleo interfásico. En el segmento de fibra solenoidal representado habrían 78 nucleosomas, y 15.000 pares de bases nucleotídicas de DNA. En la mitosis, la fibra solenoidal luego de sucesivos plegamientos conforma la cromátide del cromosoma (ver Figura 13).

sada como en la descondensada. Asimismo, se encuentra en la cromatina de los cromosomas metafásicos, en que alcanza un grado máximo de condensación. En otras palabras, todos los grados de condensación de la cromatina se alcanzan por plegamientos distintos de la fibra básica común (Figura 3). Por ejemplo, la fibra de cromatina de 30 nm de diámetro, apreciable en cortes finos de núcleos visualizados por microscopio electrónico, resultaría del giro solenoidal de la fibra básica de 11 nm de diámetro. A su vez, la fibra solenoidal se plegaría

sobre sí misma, para dar lugar a una fibra de aproximadamente 300 nm; por giros sucesivos la fibra de 300 nm daría lugar a la cromátide del cromosoma metafásico (Figura 13). En el núcleo interfásico, la cromatina está mayoritariamente presente como fibra solenoidal. Esta fibra de cromatina puede desenrollarse, haciendo posible la lectura del mensaje genético contenido en el DNA. Es necesario hacer notar que en todas las organizaciones cromatínicas mencionadas, el DNA unido a proteínas se encuentra altamente compactado y, por ende, difícilmente

accesible a las polimerasas. El mensaje genético está codificado específicamente en la secuencia de las bases nitrogenadas A, T, C y G de la molécula de DNA. Cabe imaginar entonces que, para que la lectura del mensaje sea posible, la cromatina debería ser capaz de exponer y guardar reversiblemente al DNA.

Heterocromatina

Estudiando detenidamente diferentes núcleos, se pudo apreciar la existencia de sectores cromatínicos que siempre permanecían condensados durante la interfase, y que excepcionalmente se descondensaban cuando iba a ocurrir la división mitótica. A esta fracción de cromatina de comportamiento diferente se le llamó heterocromatina. Se distinguen dos tipos principales: heterocromatina constitutiva y heterocromatina facultativa. La heterocromatina constitutiva se distribuye generalmente en las regiones pericentroméricas de algunos cromosomas, así como en zonas intercalares de los brazos cromosómicos. En estas heterocromatinas se encuentra DNA de secuencia altamente repetida, que al parecer no porta información para la síntesis de RNA o proteínas. En cambio, la heterocromatina facultativa corresponde a uno de los cromosomas X de las hembras de mamífero, el cual permanece condensado y genéticamente inactivo en las células somáticas.

ESTRUCTURA DEL NUCLEO

Envoltura nuclear

La envoltura nuclear está compuesto por dos membranas, siendo cada una de ellas una bicapa de fosfolípidos. La membrana nuclear externa se encuentra separada de la membrana nuclear interna por el espacio perinuclear, de aproximadamente 200 nm de ancho. Cada una de las membranas nucleares posee características estructurales propias, relacionándose específicamente con el citoplasma o con el interior del núcleo. La cara citoplasmática de la membrana nuclear externa se encuentra cubierta de ribosomas y en ella se realiza síntesis de proteínas.

Es muy semejante al retículo endoplásmico rugoso (RER) y se la concibe como una prolongación del sistema membranoso del RER. La cara nuclear de la membrana nuclear interna está cubierta por una capa proteica, de espesor variable según el tipo celular, que se conoce con el nombre de lámina. Debido a la íntima unión de estas dos estructuras, originalmente se nombró a la membrana nuclear interna como lámina fibrosa, haciendo resaltar en esta nominación más bien su carácter esquelético

que membranoso. Ciertamente, es la lámina la principal responsable de las funciones esqueléticas que se le reconocen a la membrana nuclear interna, como son la mantención de la forma del núcleo y la sujeción de algunos sectores de la cromatina a la envoltura nuclear.

En algunos puntos de la envoltura, ambas membranas se fusionan entre sí, generando sitios de pasaje de sustancias entre el citoplasma y el núcleo. A estos sitios se les conoce como *complejos de poro* de la envoltura nuclear (Figura 1).

Complejos de poro

Los complejos de poro de la envoltura nuclear no son sólo los agujeros que resultan de la fusión de las membranas nucleares externa e interna. Están constituidos también por un conjunto de proteínas que participan en la regulación del tránsito de sustancias desde y hacia el núcleo. En efecto, se ha observado a través de la microscopía electrónica de alta resolución, que ocho partículas dispuestas en un anillo interno y otro externo conformarían un verdadero canal, cuya permeabilidad sería selectiva. El diámetro de la abertura en el complejo de poro es de aproximadamente 10 nm, llegando a 50 nm en situaciones de apertura máxima (Figura 1). Discutiremos más adelante el significado de estos diámetros respecto del transporte nuclear.

Según el tipo celular, varía el tamaño del núcleo y también el número de complejos de poro. Se ha estimado que una célula típica de mamífero contiene aproximadamente 3.000 complejos de poro en su envoltura nuclear, cifra que equivale aproximadamente a 10 complejos de poro por μm^2 de envoltura. La superficie de envoltura nuclear ocupada por complejos de poro puede variar desde un 1% hasta un 25% del total de la superficie nuclear, correlacionándose directamente estos valores con el grado de actividad nuclear (Tabla 2).

Al respecto, es característico observar mayor concentración de poros en núcleos donde hay cromatina descondensada, y menor concentración de ellos en los núcleos con baja actividad transcritiva y gran cantidad de cromatina condensada.

Matriz nuclear

Por muchos años ha sido tema de controversia la existencia de una matriz nuclear o *carioesqueleto*. El interés en este problema ha ido en aumento, en parte por el creciente conocimiento logrado respecto de la matriz citoplasmática (también originalmente no reconocida como tal), y en gran medida por la relevancia que una entidad como ésta tendría en la estructura y fisiología del núcleo. Uno

Tabla 2
FRECUENCIA Y NUMERO DE COMPLEJOS DE PORO EN ALGUNOS TIPOS CELULARES

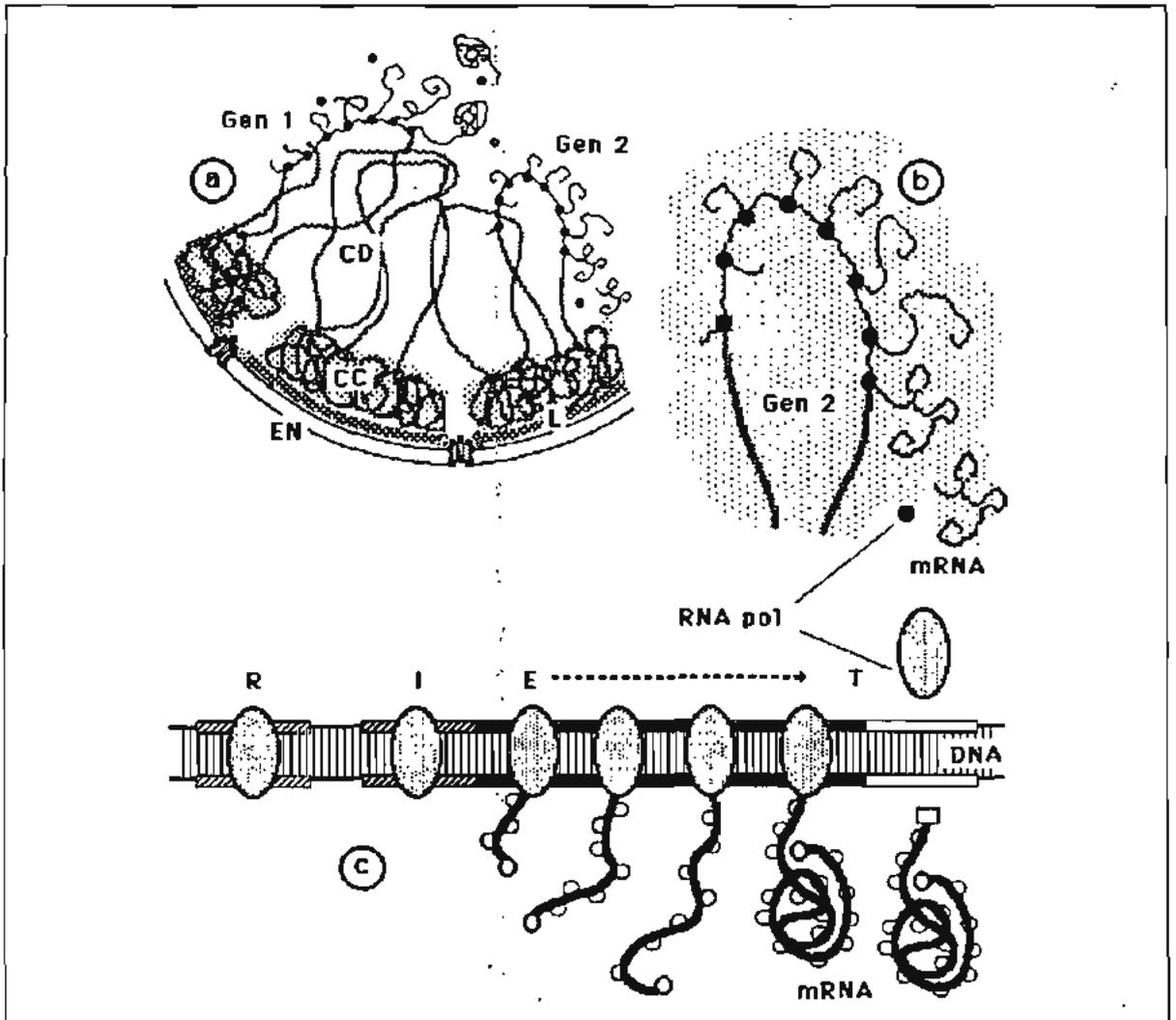
	Superficie envoltura (um ²)	Número poros/um ²	Número poros/núcleo	% envoltura ocupada por poros
Linfocito humano	90	3	270	1,4
Células HeLa en G1	250	8	2000	4
Células HeLa en S	350	11	4000	5,7
Hepatocito rata	300	30	9000	15
Ovocito anfibio	800.000	50	40.000.000	25

Ref: Berkaloff, Bourgoet, Favard y Lacruix: *Biología y Fisiología Celular* IV. Editorial Omega 1984.

de los problemas prácticos a que se enfrenta la investigación de la matriz nuclear es la presencia de la cromatina, que ocupa prácticamente todo el interior del núcleo. Actualmente, para estudiar la matriz nu-

clear se extrae la cromatina por diferentes procedimientos, permaneciendo una estructura que para algunos correspondería sólo a un artefacto técnico derivado del tratamiento. Así, en la actualidad se define la matriz del núcleo en términos operacionales, considerándola constituida por aquellas proteínas que permanecen insolubles (no extraídas) después de tratar a núcleos aislados con DNasa, RNasa, detergentes no iónicos y soluciones salinas concentradas. Todos estos tratamientos extraen DNA, proteínas histónicas, otras proteínas íntimamente unidas a la cromatina, RNA y membranas nucleares.

Se ha observado que, a pesar de lo drástico del tratamiento, se conserva una malla de proteínas que remeda la forma original del núcleo celular. En gran medida este hecho se debería a que, entre otras proteínas, se conserva la lámina, estructura que como



ya hemos visto participa directamente en la mantención de la forma nuclear. En el carioesqueleto se distingue una matriz periférica, que incluiría la lámina y complejos de poro fuertemente unidos entre sí, y una matriz interna, compuesta por un conjunto de proteínas que recién empiezan a ser conocidas, y que podrían estar conectadas a la matriz periférica. En la matriz interna del núcleo se distingue también una matriz nucleolar, que algunos postulan como otro eventual sitio de anclaje de las proteínas componentes de la matriz interna. Entre las proteínas conocidas de la matriz periférica están las tres proteínas que componen la lámina en las células de mamífero (proteínas lámina A, B y C), cuyos pesos moleculares son 70, 67 y 60 kD, respectivamente. En la interfase celular estas proteínas se unían entre sí, conformando la lámina. Entre las proteínas más abundantes de la matriz interna se encuentra la topoisomerasa II, a la que también se la conoce por ser una proteína del andamiaje ("scaffold") del cromosoma metafásico (Figura 12).

FISIOLOGIA DEL NUCLEO

La información genética es llevada a los sitios celulares o extracelulares donde se requiere, a través de moléculas que son copia de parte de la información contenida en el DNA. La información genética incluye principalmente la codificación de las moléculas de ácido ribonucleico (RNA), las que participan en la síntesis de proteínas. A su vez, las proteínas son moléculas esenciales para la estructura y metabolismo celulares. Su gran diversidad se correlaciona con la multiplicidad de procesos celulares en las que están involucradas. En una clasificación de las proteínas, que no es excluyente, es posible distinguir proteínas que son constituyentes estructurales de la célula y otras que son proteínas-enzimas. Las enzimas son importantes agentes del metabolismo celular y participan en la mayoría de los procesos celulares como síntesis y degradación de hidratos de carbono, lípidos, RNA, DNA, en la organización y movimientos celulares, etc.

Transcripción

Al proceso de síntesis de moléculas de RNA a partir del DNA como molécula molde se le conoce como transcripción. En la transcripción ocurre síntesis de moléculas de RNA, cuya secuencia de bases nucleotídicas es complementaria a una de las cadenas del DNA (Figura 4). Se reconocen tres tipos básicos de moléculas de RNA funcionales, a saber: RNA mensajeros (mRNA), RNA ribosomales (rRNA) y RNA de transferencia (tRNA). Estos RNA se distinguen entre sí por su peso molecular, su configuración espacial y, principalmente, por el rol que desempeñan en la síntesis proteica.

Los mRNA llevan codificada en su secuencia de nucleótidos la secuencia de aminoácidos que componen las diversas proteínas; de allí su diversidad en secuencia y longitud. Los rRNA, junto a proteínas ribosomales, conforman los ribosomas, que son los organelos citoplasmáticos en donde se realiza la síntesis de proteínas. Los tRNA son los encargados de llevar hacia los ribosomas los aminoácidos, que irán constituyendo la proteína en formación, de acuerdo a la secuencia de tríos de nucleótidos o codones presentes en el mRNA. Para estos efectos, el tRNA tiene al menos dos sitios de unión química, uno para el aminoácido específico y otro, el anticodón, que se une por complementariedad de bases nucleotídicas con aquéllas del codón del mRNA. Aunque la mayoría de los aminoácidos están codificados por más de un codón, y con frecuencia se unen a más de un tRNA, cada tRNA es específico para un aminoácido. Al conjunto de codones que codifican para aminoácidos, así como a las señales de inicio y término de la síntesis de proteínas, se le conoce como *código genético*.

La transcripción es realizada por enzimas conocidas como RNA polimerasas, es decir, que polimerizan nucleótidos de RNA. En eucariontes existen tres tipos de RNA polimerasas (I, II y III), cada una de ellas responsable de la síntesis de uno de los tres tipos de RNA. La RNA polimerasa I sintetiza los rRNA, la RNA polimerasa II a los mRNA y la RNA

←
 Figura 4. Lectura del mensaje genético. Transcripción. a) Parte de un núcleo en que se aprecia, en la cromatina que se ha descondensado (CD), a dos genes diferentes en transcripción (Gen 1, Gen 2). Este fenómeno se manifiesta por la aparición de fibrillas de RNA de distintos tamaños perpendiculares al eje del DNA. CC: Cromatina condensada, L: lámina, EN: envoltura nuclear. b) Detalle del Gen 2 en transcripción. La cromatina se encuentra como fibra básica o nucleosómica, y sobre ella algunas RNA polimerasas (RNA pol), cada una con un RNA en crecimiento. Se aprecia el sentido de progresión de la síntesis, puesto que el RNA transcrito es de mayor tamaño al alejarse la RNA polimerasa del origen del gen. La fibrilla de RNA adopta diferentes configuraciones dependiendo de su longitud y de las proteínas que se le asocian. c) Esquema del DNA en transcripción, o "unidad de transcripción". Se representa la RNA polimerasa II sobre el DNA en el sitio de reconocimiento (R), su posterior desplazamiento al sitio de iniciación de transcripción (I), su recorrido sobre el DNA en la fase de síntesis del mRNA o de elongación (E), hasta su desprendimiento en el punto de terminación (T). Resulta un mRNA precursor, cuya longitud depende de la del gen en transcripción. El RNA se asocia a proteínas, formando un gránulo de RNP.

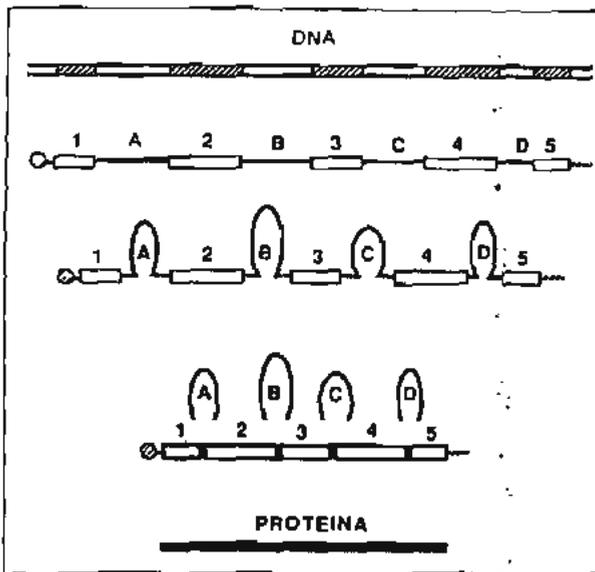


Figura 5. Procesamiento. A partir de un DNA molde, es transcrito un RNA pre mensajero. El pre mRNA que se ilustra está compuesto por cinco exones (1-5) y cuatro intrones (A-D). Se representa además el Cap en su extremo inicial (extremo 5') y la cola poli-A en su extremo final (extremo 3'). Mediante "corte y empalme" se excienden los intrones, y se unen ordenadamente entre sí los exones, formándose el RNA mensajero maduro. El RNA mensajero es transportado al citoplasma, donde es traducido en una proteína.

polimerasa III a los tRNA. Nos referiremos por ahora a la síntesis de mRNA y tRNA, y describiremos la síntesis de los rRNA cuando analicemos la organización del nucléolo.

En el lugar de síntesis la cromatina se descondensa, los nucleosomas experimentan cambios de conformación, el DNA se hace accesible a las polimerasas (Figura 4), y así se da curso a la iniciación del proceso de transcripción. La iniciación implica el reconocimiento, por la RNA polimerasa, de un sitio específico en el DNA, conocido como promotor, la apertura local de las cadenas del DNA y la unión de la polimerasa al DNA. Luego, en la llamada etapa de *elongación*, la RNA polimerasa se desplaza sobre el DNA, sintetizando sólo en sentido $5' \rightarrow 3'$ una cadena de RNA complementaria a una de las cadenas del DNA. En realidad, no se sabe

exactamente si es el DNA el que se desplaza a través de la polimerasa que estaría fija, o viceversa. En estos términos, el avance de la polimerasa, y la consiguiente síntesis de RNA, progresan hasta un sector del DNA en que la polimerasa se desprende, y de ella el producto de transcripción, etapa que se conoce como *terminación* (Figura 4c). A todo el segmento de DNA que es transcrito, más el sitio de reconocimiento y el de término, se los conoce como *unidad de transcripción*. Según la localización de una unidad de transcripción, se transcribe una u otra cadena del DNA y, como las dos cadenas son antiparalelas y la transcripción es unidireccional, las polimerasas respectivas progresan en sentido opuesto.

Ribonucleoproteínas (RNP)

Los RNA son moléculas monocatenarias que adoptan configuraciones especiales diversas, debido a plegamientos internos que se estabilizan por el apareamiento parcial de sus bases nucleotídicas complementarias (Figura 4). Además, los RNA, junto con proteínas específicas, forman complejos moleculares que aparecen dentro del núcleo como partículas densas, y que se conocen como gránulos de ribonucleoproteínas o RNP.

Dentro del núcleo, los RNA también experimentan diversos tipos de cambios en su estructura, después de, o simultáneamente con su transcripción. A estos cambios en su conjunto se les denomina *procesamiento* de los RNA. En los tRNA, estas modificaciones consisten principalmente en la agregación de grupos químicos que modifican su apareamiento nucleotídico interno, y consecuentemente su configuración espacial.

Los RNA transcritos que darán origen a mRNA, a los que se los designa como pre-mRNA, experimentan modificaciones tanto en sus dos extremos, como en el interior de la molécula (Figura 5). Al extremo 5' de los pre-mRNA se agrega usualmente una metil guanosina, conocida también como Cap, y al extremo 3', una serie de nucleótidos de adenina o cola poli-A. En el interior de los pre-mRNA ocurre con frecuencia la eliminación de segmentos intermedios (intrones) de la molécula, y un empal-

Figura 6. Nucléolo. Síntesis de RNA ribosomal. a) Parte de un núcleo con cromatina descondensada (CD), y un sector de concentración de RNP ribosomales o nucléolo (NU). CC: cromatina condensada, EN: envoltura nuclear, L: lámina. b) Imagen conocida como pinos de navidad. Se muestran sólo siete de los cientos de genes nucleolares o ribosomales (GR). Cada uno de ellos aparece cubierto por múltiples RNA polimerasas, que simultáneamente sintetizan RNA ribosomal. Como producto resultan numerosos RNA ribosomales 45S. c) Esquema de un gen ribosomal en transcripción. Hay múltiples RNA polimerasas (RNA pol I), una al lado de la otra desde el origen del gen hasta su término, que están simultánea y progresivamente sintetizando RNA ribosomal. El RNA se sintetiza en sentido $5' \rightarrow 3'$ (flecha). La concordancia entre el crecimiento de los transcritos y la dirección de la síntesis señala que es una la cadena del DNA que está siendo transcrita.

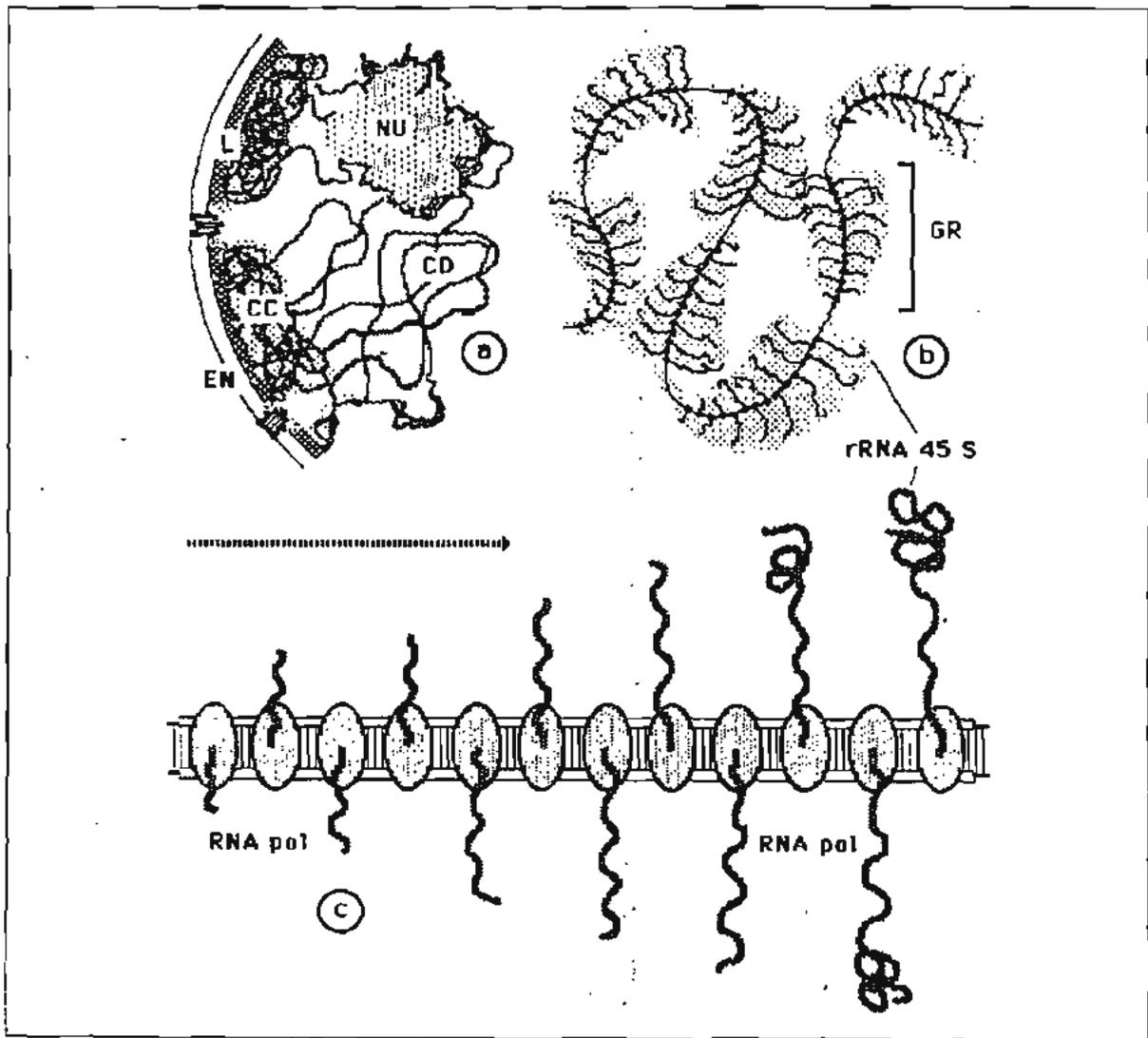
me de los segmentos restantes. De esta manera, el mRNA resulta a menudo más corto que el segmento de DNA que le dio origen; en esta condición será posteriormente traducido en la síntesis de proteínas (Figura 5). Algunas de las modificaciones que experimentan los pre-mRNA, como el corte y empalme (splicing), ocurren también en el procesamiento de otros tipos de RNA.

Tanto la síntesis de los RNA, como sus modificaciones, son actividades nucleares permanentes que se reflejan morfológicamente en la gran cantidad de fibrillas o gránulos de RNP que acompañan a la cromatina descondensada.

Transporte nuclear

Transporte nuclear se refiere al pasaje de sustancias desde y hacia el núcleo. Ha sido difícil su estu-

dio con los métodos tradicionales de observación de células fijadas. Sin embargo, la microinyección de sustancias de tamaño conocido en el citoplasma de células vivas y la comprobación de su ingreso al núcleo, han sido importantes en la investigación de este fenómeno. Se ha podido comprobar que el tránsito de partículas es bidireccional; se realiza a través de los complejos de poro y no ocurre en otros puntos de la envoltura nuclear. También se ha observado que el tránsito de partículas de gran tamaño es un proceso activo, es decir, que requiere energía, mientras que partículas del orden de 10 nm pueden difundir libremente desde y hacia el núcleo. Estas observaciones indican que el flujo de partículas pequeñas tendría relación directa con el diámetro del complejo de poro, en tanto que el tránsito de grandes complejos moleculares sería posible por el



trabajo activo de las proteínas de los complejos de poro.

Por otra parte, se ha demostrado que ciertas proteínas adoptan una localización exclusivamente nuclear. Estas, tras breve tiempo luego de su síntesis en el citoplasma, se sitúan en el interior del núcleo. Tales observaciones llevaron a suponer que existía algún tipo de información que señalaba el destino y permanencia de esas proteínas en el núcleo. Actualmente, se conoce una secuencia de 7 aminoácidos, denominada secuencia señal, que es capaz de definir por sí sola el destino nuclear de una proteína.

Para probar su efectividad, tal secuencia ha sido experimentalmente incorporada en la estructura de proteínas típicamente citoplasmáticas, las cuales de este modo pasan a quedar localizadas en el núcleo. No se sabe aún en qué nivel celular está el reconocimiento de estas secuencias aminoacídicas. Es posible que un primer nivel sea citoplasmático o de orientación hacia el núcleo; que otro más riguroso esté a nivel del complejo de poro; y que un último nivel, al interior del núcleo, signifique la permanencia o retención de dicha proteína. En todo caso, la misma secuencia de aminoácidos no ha sido descubierta en todas las proteínas nucleares, lo que sugiere que el sistema sería de mucho mayor complejidad pudiendo existir además otras señales de reconocimiento.

Nucléolo

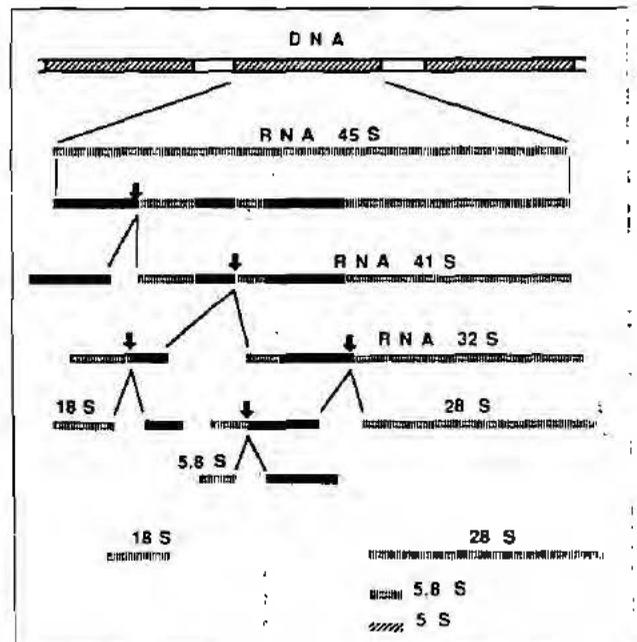
El nucléolo es una estructura destacada dentro del núcleo. Está formado principalmente por fibrillas y gránulos de ribonucleoproteínas ribosomales (rRNA), y es el centro de producción, procesamiento y maduración de los rRNA. El nucléolo

constituye el único ejemplo de actividad transcritiva que se concentra en un territorio nuclear, constituyendo una entidad morfológicamente apreciable incluso al microscopio de luz (Figuras 1 y 6a). Su número y tamaño está sujeto a variaciones que son dependientes de la disponibilidad de genes ribosomales, así como de la demanda celular por ribosomas. La demanda por síntesis de nuevos ribosomas es a su vez dependiente del recambio celular de estos organelos, y del mayor o menor requerimiento de síntesis de proteínas.

Las células secretoras, por ejemplo, debido a su gran actividad de síntesis, son las que presentan un mayor desarrollo de sus nucléolos. Los genes o citrones ribosomales se presentan en cientos de copias, separadas entre sí por cortos segmentos de DNA que no son transcritos, y que se les conoce como espaciadores ("spacers"). Al conjunto de genes ribosomales localizados en un segmento de un cromosoma se le conoce como organizador nucleolar (NOR), y al cromosoma portador del NOR como cromosoma nucleolar.

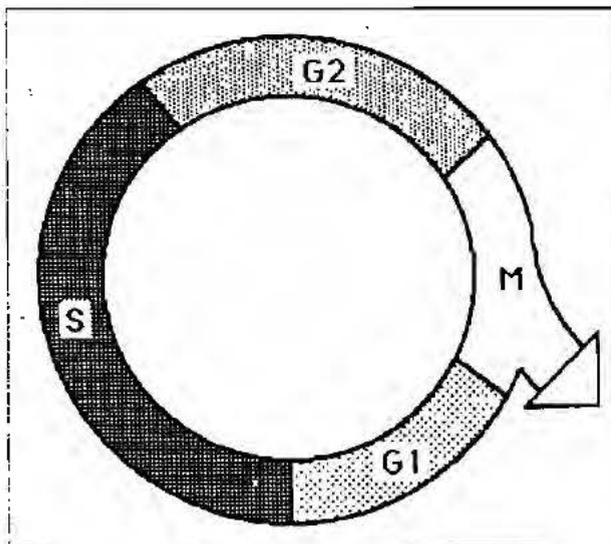
El número de cromosomas nucleolares por cariotipo es variable. Por ejemplo, en el ratón existen tres pares, en la chinchilla un par, y en el hombre cinco pares de cromosomas nucleolares (Figura 15). Los cromosomas nucleolares tienden a asociarse a través de sus regiones NOR cuando éstas están en activa transcripción, por lo que es frecuente observar un menor número de nucléolos que los NOR involucrados en su organización.

Figura 7. Procesamiento del RNA ribosomal precursor en eucariontes. De cada gen ribosomal (DNA) son transcritos numerosos RNA precursores 45S (RNA 45S), que experimentan una serie de particiones que dan lugar a RNA ribosomales más cortos, que pasarán a constituir las subunidades ribosomales. Se han representado secuencialmente los sitios de corte (flechas) y los fragmentos resultantes. En negro se señalan los segmentos de RNA que se pierden, y en achurado los que constituirán RNA ribosomales. La primera modificación del RNA 45S es la pérdida de un extremo, resultando un RNA 41S. El segundo corte da lugar a un RNA que contiene al 18S y un segmento que es eliminado a continuación, y a un RNA 32S. Este se corta en dos fragmentos, uno que luego de la pérdida de un segmento dará lugar al 5,8S, y otro que es el 28S. Los RNA ribosomales resultantes son el 18S, que formará parte de la subunidad ribosomal menor y los RNA ribosomales 28S y 5,8S. Estos, junto a un RNA no sintetizado en el nucléolo y de tamaño 5S, formarán la subunidad ribosomal mayor.



Cada NOR está compuesto por cientos de genes ribosomales, y cada gen ribosomal puede ser transcrito simultáneamente por decenas de RNA polimerasas (Figuras 6b y 6c). Esto fue observado por primera vez en nucléolos aislados y dispersados en soluciones salinas de baja fuerza iónica, en los que fue posible visualizar el rDNA sobre el cual se disponían en secuencia las RNA polimerasas. De cada polimerasa pendía una fibrilla de RNA, cuya longitud era mayor en la medida que la polimerasa se encontraba más lejos del punto de inicio de la transcripción del gen. Debido a su aspecto, a los genes ribosomales con las fibrillas de RNA de tamaños crecientes se les llamó pinos de navidad (Figura 6b).

Al término de la transcripción de cada gen, se desprende la RNA polimerasa y de ella el rRNA transcrito. El rRNA sufre un procesamiento que consiste en la partición del rRNA original 45S en dos más pequeños, de 18S y 32S. A su vez el rRNA 32S es fragmentado nuevamente en 5,8S y 28S (Figura 7). El rRNA 18S unido a proteínas constituye la partícula prerribosomal pequeña, y que es transportada directamente al citoplasma. A los rRNA 5,8S, 28S más un rRNA 5S, codificado en otra región cromosómica, se agregan proteínas ribosomales específicas constituyendo la partícula prerribosomal mayor. De esta manera, en un nucléolo activo existe rDNA, transcripción del mismo, fibrillas de rRNA y gránulos de RNP. Asimismo, la gran actividad sintética propia del nucléolo va acompañada de un flujo constante de proteínas ribosomales desde el citoplasma hacia el núcleo, como también de productos nucleolares (subunidades prerribosomales) desde el núcleo hacia el citoplasma.



DIVISIÓN DE LA CELULA

Ciclo proliferativo

Las células tienen la capacidad de dividirse, dando lugar a dos células hijas genéticamente idénticas entre sí. A la división celular se le conoce como mitosis, y es la culminación de un proceso celular complejo, que se inicia mucho antes en el tiempo. Quizá el evento previo más connotado es la replicación del DNA. Este proceso ocurre durante la interfase celular en el período llamado S, o de síntesis, y su duración tiene una gran regularidad. En una célula en proliferación, entre el período S y la mitosis, así como entre la mitosis y el siguiente período S, existen espacios ("gap") de tiempo que se denominaron G2 y G1, respectivamente (Figura 8). A estos períodos inicialmente se les supuso carentes de actividades celulares. Actualmente, se sabe que son muchos los eventos celulares que en ellos ocurren. Por ejemplo, durante G2 se sintetizan las proteínas que constituirán el huso mitótico, y ocurre la reparación del DNA que se ha replicado en S. Durante G1 ocurre la decisión celular de continuar en ciclo proliferativo, o derivar hacia la diferenciación celular. No se conoce un fenómeno molecular único que conduzca a tal decisión, sino que se supone que es un conjunto de eventos los que inducen a que la célula se oriente hacia la división o a la diferenciación.

Al término de la mitosis, la célula puede continuar en proliferación pasando secuencialmente de G1 a S, G2 y nuevamente a M; o bien, puede dejar de proliferar, pasando a un estado de reposo proliferativo y diferenciación conocido como G0. También se sabe que algunas células abandonan el ciclo proliferativo desde la etapa G2, en cuyo caso su contenido de DNA es el doble del que tiene una célula en G1 ó G0.

Como nuestro propósito actual es estudiar el núcleo y el material hereditario, revisaremos a continuación con mayor detalle la replicación del DNA y la mitosis.

Replicación del DNA

En los organismos eucariontes el proceso de replicación del DNA ocurre simultáneamente en varios puntos. En cada lugar en que ocurre la replicación es posible apreciar a través del microscopio electrónico los llamados ojales de replicación. Estos



Figura 8. Ciclo proliferativo. Esquema del ciclo proliferativo celular con las etapas G1, S, G2 y M que lo componen. La flecha representa las células resultantes de una mitosis y que pueden salir del ciclo proliferativo.

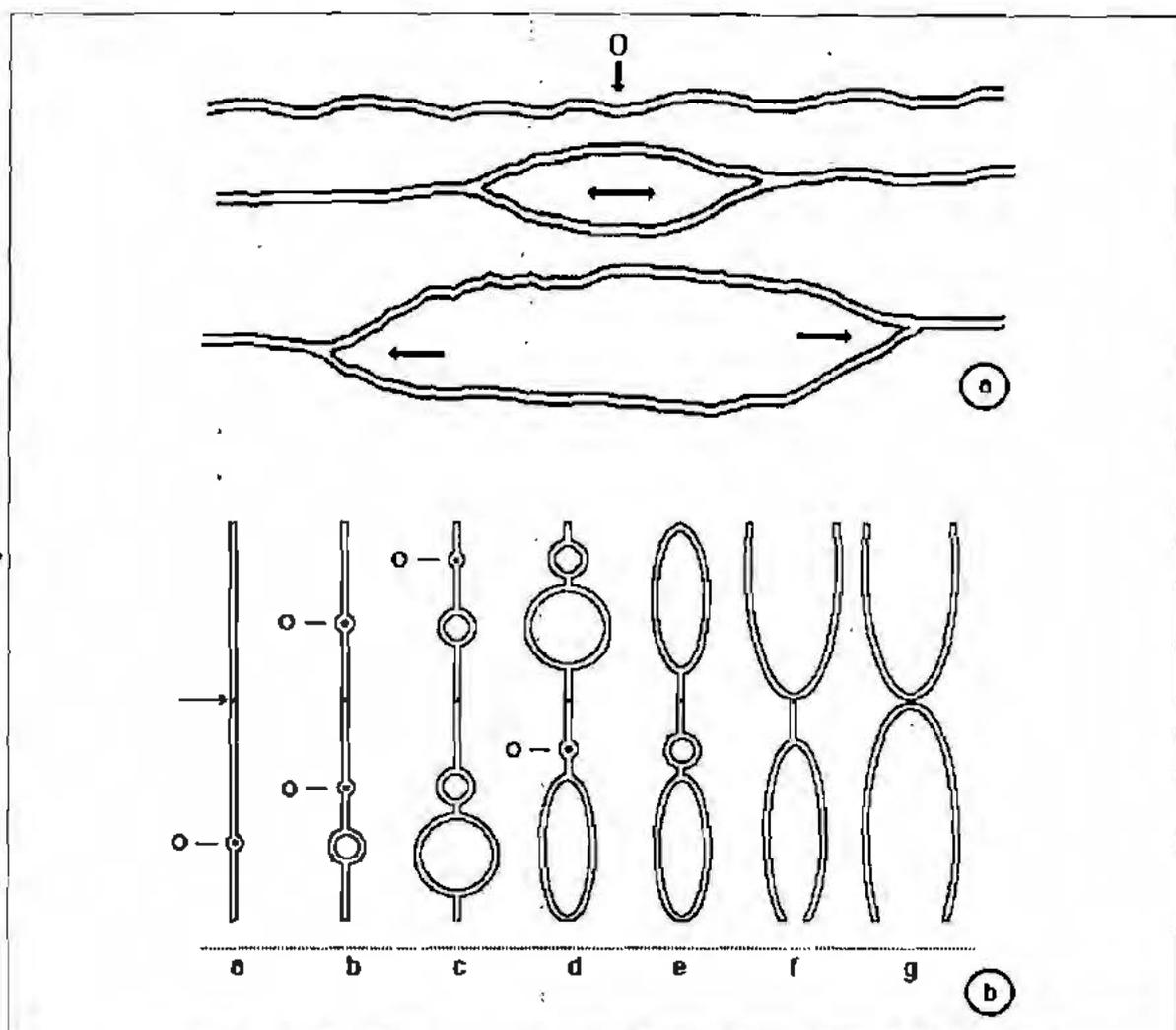


Figura 9. Ojales de replicación del DNA. a) Desde un origen (O flecha) se inicia la replicación del DNA, apareciendo un "ojal de replicación". Este se expande bidireccionalmente (flechas) y en sus extremos se forman las horquillas de replicación, que son los sitios en donde un conjunto de enzimas va duplicando el DNA. b) Asincronía replicativa del DNA durante la fase S del Ciclo Celular. En distintos momentos (a-g) y a partir de diferentes orígenes (O) aparecen ojales de replicación, que al expandirse convergen para dar como resultado dos moléculas de DNA idénticas. La flecha señala la región centromérica del cromosoma, cuyo DNA al replicar tardíamente, conserva unidas las dos cromátidas (ver Figura 11).

parecen tener una localización fija, y el crecimiento de cada uno de ellos es bidireccional a través de las llamadas horquillas de replicación, que se encuentran en cada extremo de un ojal (Figura 9a). En el tiempo, se va extendiendo el tamaño de cada ojal hasta converger con otros, resultando así dos DNA de doble cadena e idénticos entre sí. Cada molécula de DNA resultante está formada por una cadena vieja y otra nueva, lo que define el carácter semi-conservativo de la replicación del DNA. A cada uno de los segmentos de DNA que replican independientemente se les llama unidades de replicación o replicones.

Las múltiples unidades de replicación de cada núcleo duplican el DNA en un determinado orden en el tiempo; es decir, existen replicones que duplican primero y otros después, siguiendo siempre el mismo patrón regular en todos los períodos S en una misma línea celular. A este fenómeno también se le conoce como asincronía replicativa (Figura 9b).

En cada replicación, la replicación es llevada a cabo por una DNA polimerasa (alfa), que es una enzima de alto peso molecular, compuesta por varias sub-unidades. La DNA polimerasa une los desoxirribonucleótidos en el sentido $5' \rightarrow 3'$, siguiendo un orden determinado por la complementariedad con los

nucleótidos del DNA molde, y siempre que exista una cadena ya iniciada con un extremo OH 3' libre. Al respecto, se ha encontrado que la síntesis del DNA se inicia con la síntesis de un corto RNA, conocido como cebador (primer), cuyo último nucleótido deja un OH 3' libre, a partir del cual se inicia la polimerización de una cadena nueva del DNA (Figura 10). La síntesis del DNA se realiza únicamente en sentido 5' → 3', y ambas cadenas en replicación consútyen moldes antiparalelos.

Luego, en cada horquilla de replicación sólo una de las cadenas en crecimiento coincide con el sentido en que se va abriendo el DNA molde. La otra cadena crece también en sentido 5' → 3'; pero mediante fragmentos de 100 a 200 nucleótidos de extensión, conocidos como fragmentos de Okazaki. Tanto la cadena de crecimiento continuo como la de crecimiento discontinuo utilizan RNA como cebadores, los que quedan localizados entre los fragmentos de DNA replicados (Figura 10a). Posteriormente, una ribonucleasa (Ribonucleasa H) hidroliza

los cebadores, y una segunda DNA polimerasa (beta) polimeriza los nucleótidos de DNA faltantes. Los segmentos de DNA nuevo son unidos covalentemente entre sí, por la acción de una enzima llamada ligasa. En todo este complejo proceso participan además otras enzimas y proteínas, que se conocen en conjunto como conformacionales. Ellas desenrollan el DNA, relajan la tensión producida en el DNA por su desenrollamiento, abren sus cadenas y las mantienen abiertas cuando éstas se están replicando, etc.

El DNA en los eucariontes se encuentra junto con las histonas conformando la cromatina. ¿Qué ocurre con las histonas cuando el DNA se duplica? Hasta hace poco no se sabía si en el ensamblaje de la cromatina en los lugares de duplicación del DNA se usaban sólo histonas nuevas o una mezcla de las antiguas y las nuevas. Actualmente se sabe que durante el período S existe síntesis de nuevas histonas en el citoplasma, las que son transferidas al núcleo. Las proteínas histónicas antiguas, así como los nu-

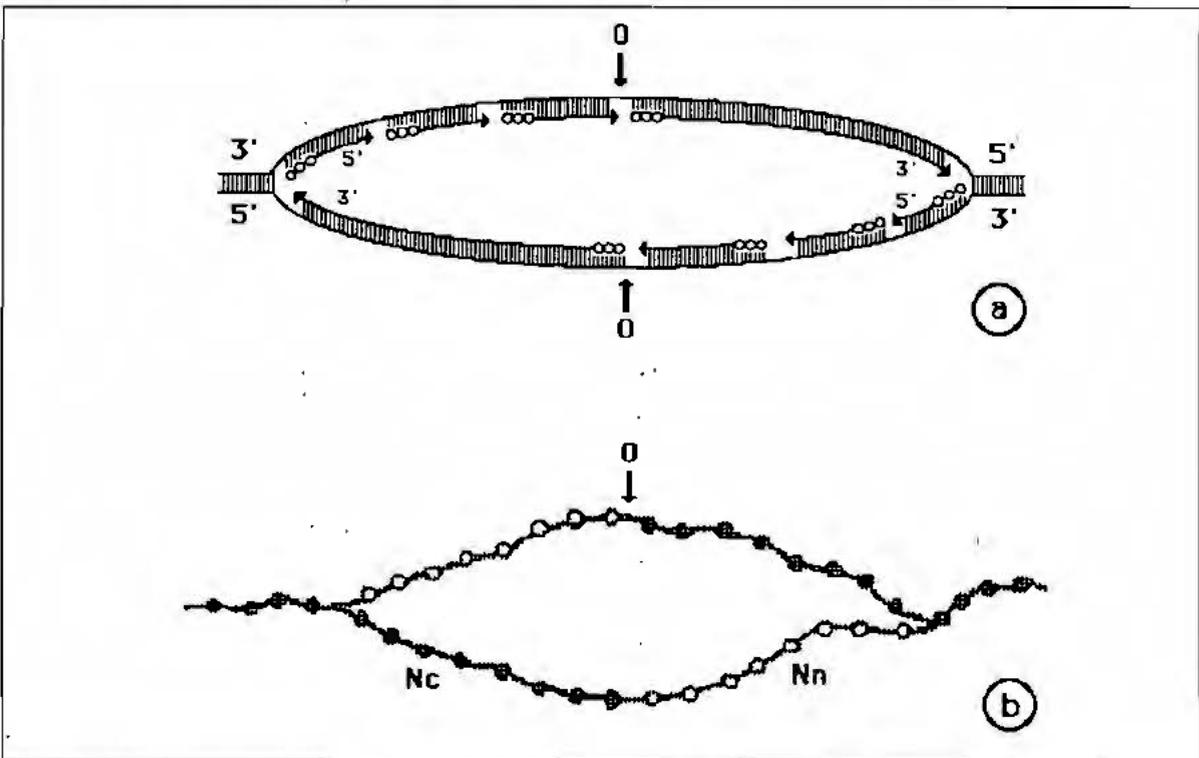


Figura 10. Fragmentos de Okazaki. a) En la replicación del DNA, las dos nuevas cadenas crecen en sentido 5' → 3'. Una de las cadenas crece en la dirección de la apertura de una horquilla de replicación (cadena de replicación continua). La otra cadena crece opuesta al sentido de apertura de esa horquilla, y replica en fragmentos de Okazaki. Lo mismo ocurre con las cadenas del DNA en la otra horquilla, pero en situación inversa. Las flechas verticales señalan el punto de origen de la replicación (0). Los círculos pequeños (ooo) indican los RNA cebadores (primer). Las puntas de flecha en el DNA indican el sentido 5' → 3' del crecimiento de las nuevas cadenas de la molécula. b) Distribución de nucleosomas conservados y nuevos en la cromatina durante la duplicación del DNA. Los nucleosomas conservados se localizan junto al DNA de replicación continua (Nc). Nucleosomas nuevos se localizan junto al DNA de replicación discontinua (Nn) (ver texto).

cleosomas que se encuentran estructurando, se conservan y se localizan preferentemente junto a las cadenas de DNA en las que ha habido crecimiento continuo. Las histonas nuevas conforman nucleosomas nuevos, que se ubican en los segmentos del DNA en que ha habido replicación discontinua (Figura 10b). Así, inmediatamente después de replicado el DNA, se conforma el agregado macromolecular de la fibra nucleosómica.

Mitosis

Durante la mitosis se produce la división de una célula vegetal o animal en otras dos, que son iguales entre sí. En gran medida, este resultado es posible debido a la fidelidad con que ocurre la replicación del DNA, que produce dos genomas idénticos, y a la eficacia con que se distribuyen los cromosomas en la mitosis. En la mitosis también ocurre la repartición del citoplasma de la célula progenitora entre dos células hijas. En esta parte del fascículo nos concentraremos especialmente en estudiar qué ocurre con el núcleo y el material hereditario.

Uno de los primeros indicios de que sobrevendrá una mitosis es la gradual condensación de la cromatina en el núcleo. Este fenómeno se manifiesta morfológicamente por la aparición de finos filamentos dentro del núcleo, los que progresivamente se van engrosando y acortando. Paralelamente, se aprecian microtúbulos en el citoplasma próximo a la periferia del núcleo, los que se van orientando en relación a dos polos celulares.

Aunque la mitosis es un proceso relativamente rápido y continuo, los eventos que en ella ocurren configuran etapas discretas (Figura 11). Lo que describíamos como primeros cambios del núcleo corresponde a la *profase*, y su término se define por el desensamblaje de la envoltura nuclear. La envoltura nuclear desaparecería por desagregación del polímero proteico que conforman las proteínas lámina, y por vesiculación de las membranas nucleares.

En la *metafase*, los cromosomas alcanzan su máxima condensación, y se disponen en el ecuador celular dirigidos por microtúbulos cromosómicos insertos en los cinetocoros de sus regiones centro-

méricas. Los microtúbulos se orientan entre sí formando una estructura conocida como huso, debido a su forma. Las cromátides hermanas que componen cada cromosoma comienzan a separarse entre sí. Ello ocurre principalmente a través de las regiones centroméricas, que son traccionadas hacia los polos celulares, los cuales en las células animales están definidos por los centrólolos.

Cuando ocurre la migración cromosómica durante la *anafase*, cada cromátide hermana pasa a ser un cromosoma independiente. Todos los cromosomas migran orientados con sus centrómeros hacia un polo y con los telómeros hacia el ecuador celular, disposición que se conoce como polarización de Rabl.

En la siguiente y última etapa, la *telofase*, comienza la reorganización del núcleo con los cromosomas que ya están ubicados en el polo celular. La envoltura nuclear se adhiere por parches a algunos sectores cromosómicos. Se sabe que en esta etapa de organización del núcleo también hay participación de las proteínas lámina. Las vesículas de membranas nucleares se van haciendo cada vez más continuas por unión de unas con otras. La cromatina de los cromosomas se va progresivamente descondensando. El núcleo, que inicialmente seguía en su forma a los cromosomas, se va hidratando, aumentando su volumen y adquiriendo una forma esférica (Figura 11).

El conocimiento que se tiene acerca de las fases de desensamblaje del núcleo (*profase*), y de ensamblaje de éste en la *telofase*, se ha visto reforzado recientemente por el desarrollo de modelos de reconstitución de núcleos artificiales en sistemas libres de células (Figura 12). En estos experimentos, se usó un DNA viral (DNA de bacteriófago lambda), al cual se le fueron agregando histonas en la proporción adecuada. Bajo estas condiciones, se obtuvo una fibra nucleosómica prácticamente idéntica a la natural.

A la fibra nucleosómica se agregó topoisomerasa II, factor que logró plegar la fibra nucleosómica en agregados macromoleculares semejantes a un cro-

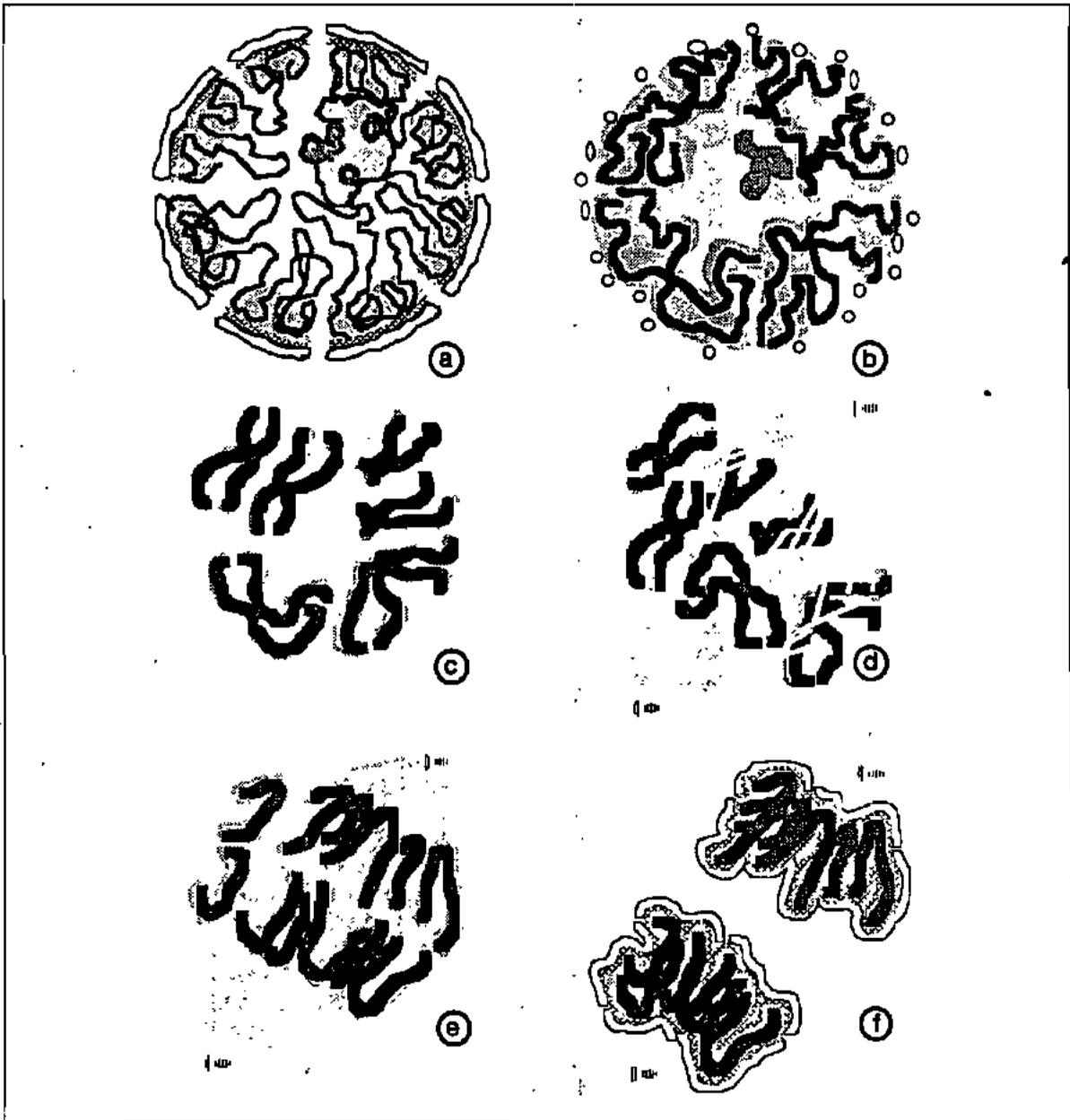
Figura 11. Etapas de la mitosis. a) *Profase*. La cromatina se condensa progresivamente en fibras cada vez más gruesas. El nucléolo y la envoltura nuclear se mantienen presentes. b) *Profase tardía*. Los cromosomas ya visibles se orientan preferentemente hacia la periferia del núcleo, se desensambla la envoltura nuclear y se desorganiza el nucléolo. c) *Prometafase*. La envoltura nuclear y el nucléolo ya no se observan. Los cromosomas más cortos y gruesos tienen dos cromátides. d) *Metafase*. Se organiza el huso mitótico cuyos microtúbulos se sitúan entre los polos celulares definidos por los centrólolos (célula animal). Los cromosomas se orientan radialmente en el ecuador de la célula debido a la unión de microtúbulos a sus regiones centroméricas. e) *Anafase*. Se separan las cromátides de cada cromosoma duplicado, migrando los nuevos cromosomas hacia los polos celulares, con sus regiones centroméricas orientadas hacia los polos y sus regiones teloméricas hacia el ecuador celular. f) *Telofase*. Alrededor de cada conjunto cromosómico comienza la formación de la envoltura nuclear y la reorganización de los núcleos hijos.

mosoma mitótico. Seguidamente, a estos "cromosomas" se los puso en contacto con proteínas aceptoras de lámina, proteínas lámina y vesículas de envoltura nuclear, produciéndose un núcleo cuyo aspecto morfológico y algunas de sus funciones principales, aparecían muy similares a las de un núcleo natural.

Estos estudios demostraron que la organización de un núcleo se produce como resultado de la integración ordenada de determinados elementos nucleares. En efecto, cada nueva fase experimental requería que se hubiera completado el proceso de

ensamblaje inmediatamente anterior. Asimismo estos núcleos lograron duplicar parte de su DNA. Tal replicación sólo se producía después que la envoltura nuclear se había formado, indicando que la presencia de la envoltura en contacto con la cromatina era importante en la regulación de la replicación del DNA.

Indudablemente, estos modelos abren un importante campo para la experimentación en la organización de núcleos artificiales y naturales. Asimismo, demuestran que a pesar de la complejidad que tiene el núcleo, es posible inducir su autoensambla-



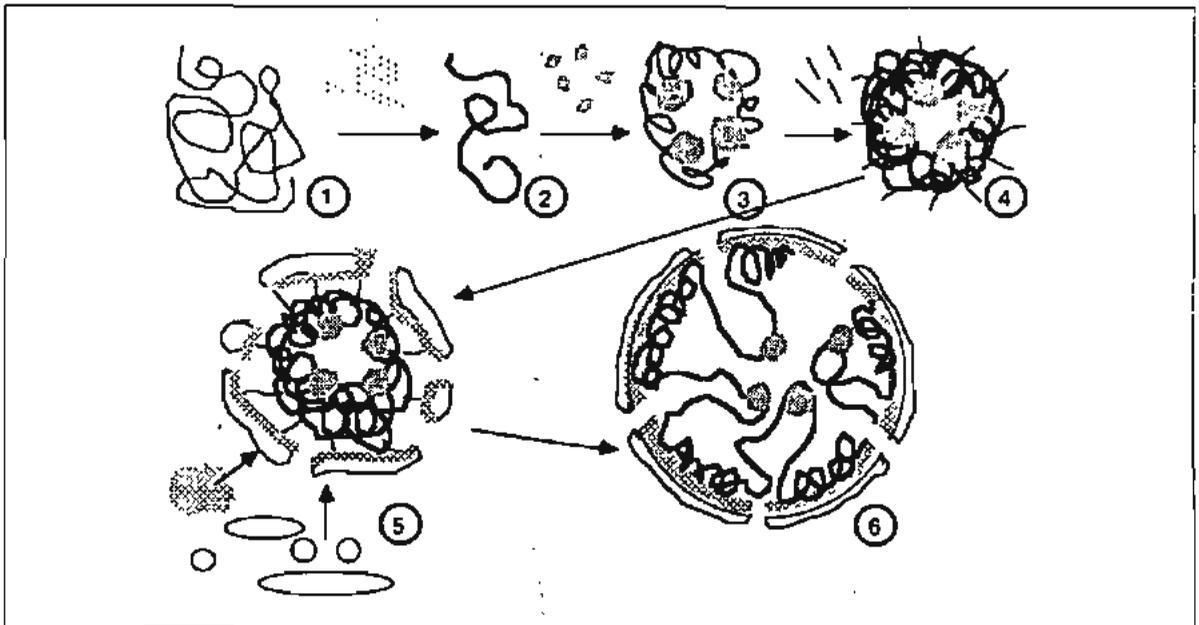


Figura 12. Reconstitución experimental de núcleos. Secuencia de la reconstitución experimental *in vitro* de núcleos en un sistema libre de células. Al agregar a moléculas de DNA (1) proteínas histónicas en proporciones y condiciones adecuadas, es posible reconstruir cromatina (2). A su vez, al agregar topoisomerasas (proteína del esqueleto nuclear y cromosómico) a la cromatina, ésta se repliega sobre sí misma, apareciendo cromatina condensada similar a la nuclear o a la cromosómica (3). La adición de proteínas receptoras de lámina que se unen a la cromatina (4), posibilita la unión de éstas con proteínas lámina y vesículas de membrana, desencadenando la formación de envoltura nuclear sobre esta cromatina (5). Los núcleos así producidos, se organizaron en forma semejante a un núcleo interfásico natural (6), y fueron capaces de iniciar la replicación del DNA, (Newport, Cell 48: 205-217, 1987).

je a partir de elementos básicos no necesariamente pertenecientes a un mismo organismo.

Cromosomas

Durante la división celular, y en particular durante la metafase, es posible distinguir los cromosomas. Esto se debe a la gran condensación que alcanza la fibra de cromatina que compone a cada uno de ellos (Figura 13). Los cromosomas son constantes en número y morfología en las células de un mismo organismo. Aún más, todos los organismos pertenecientes a una misma especie presentan los mismos cromosomas; de allí que se pueda reconocer un estándar o cariotipo por especie. Entre las especies emparentadas, los cromosomas tienden a ser muy semejantes en número y morfología, mientras que entre aquellas muy lejanas son bastante diferentes. Esta afirmación es válida sólo como una apreciación muy general.

La morfología cromosómica está definida por la localización del centrómero, o constricción primaria, a lo largo del cromosoma. De acuerdo a esto es posible distinguir cromosomas metacéntricos, que poseen el centrómero en el centro, cromosomas submetacéntricos, con el centrómero subcentral, cromosomas subteloicéntricos, de centrómero sub-

terminal y cromosomas telocéntricos, que tienen centrómero terminal (Figura 14).

En los organismos de reproducción sexuada, los cromosomas están representados en pares homólogos, debido al aporte de dos conjuntos cromosómicos haploides, uno paterno y otro materno. Los cromosomas homólogos tienen igual morfología y son portadores de los mismos genes. En el hombre existen 46 cromosomas, de los cuales 22 pares son autosómicos y uno es el par sexual, siendo XX en las mujeres o XY en los varones (Figura 15).

Desde el punto de vista genético, cada cromosoma constituye un grupo de genes ligados que se heredan en conjunto. A través de técnicas especiales, es posible obtener bandas transversales a lo largo de los cromosomas, hecho que pone en evidencia la heterogeneidad longitudinal de la cromatina. La secuencia de bandas de un cromosoma es equivalente a la secuencia de cromómeros que surgen del plegamiento diferencial de dominios de la cromatina (Figura 13). Estudios de mayor resolución han permitido establecer que los genes se localizan en dominios específicos y en determinadas bandas de los cromosomas.

Por otra parte, si analizamos el DNA total de cada cromosoma veremos que, además de los genes

correspondientes a segmentos de DNA de secuencia única o medianamente repetida, están también los DNA de secuencia altamente repetida, que aparentemente no son transcritos. Estos últimos, que pueden estar acumulados en determinados sectores cromosómicos o estar distribuidos en forma intercalar, pareciera que cumplen un rol en la estructura del cromosoma y en la organización del núcleo.

DIFERENCIACION NUCLEAR

Fenotipo nuclear

La diferenciación celular se puede definir, operacionalmente, como la adquisición progresiva de nuevas características por parte de las células descendientes respecto de las células progenitoras. Estas diferencias se manifestarían en las proteínas

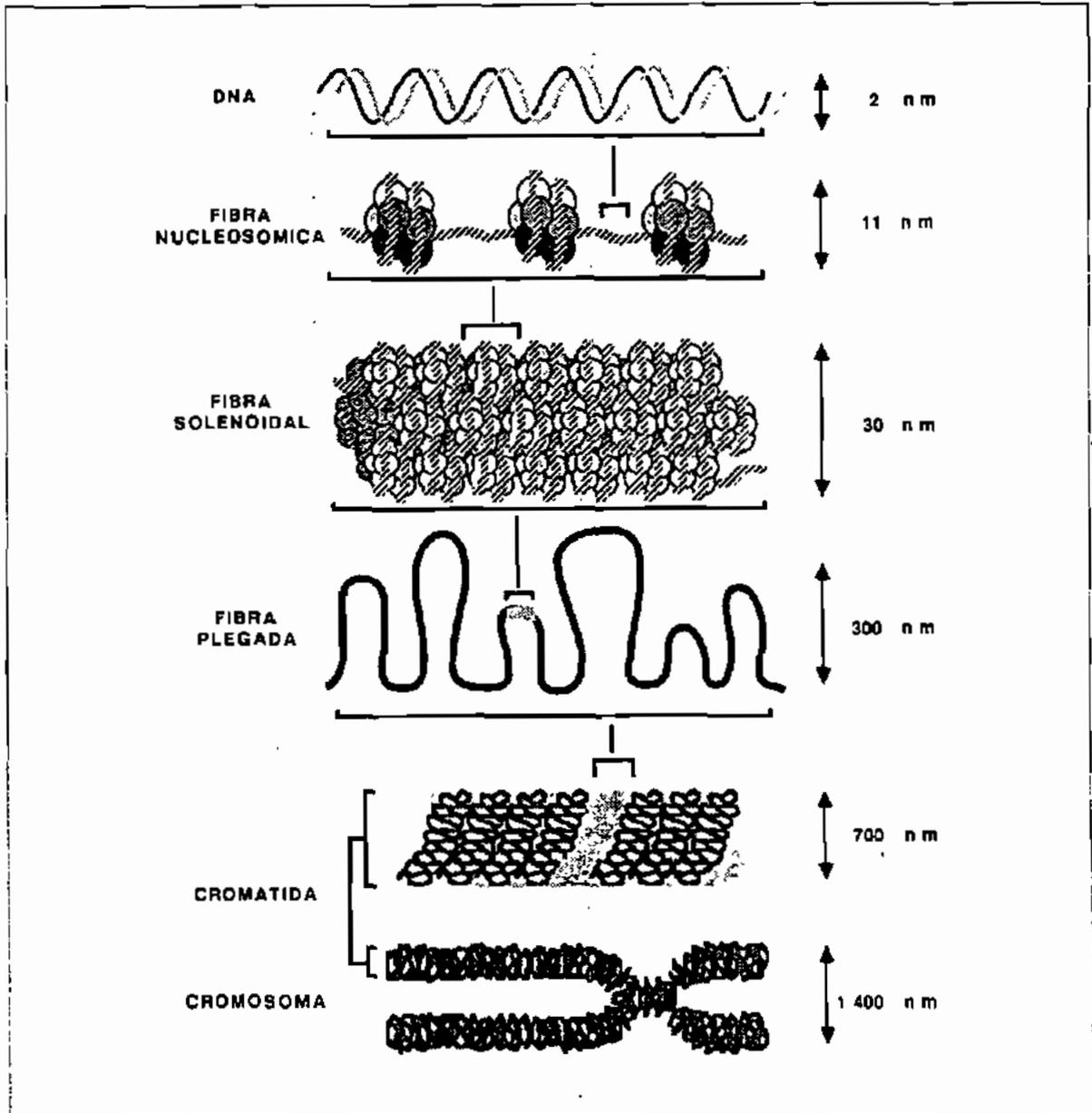
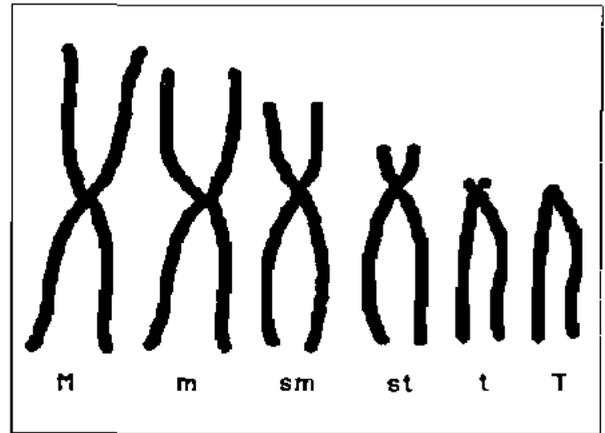


Figura 13. Estructura del cromosoma metafásico. Niveles de progresivo plegamiento del DNA y de la cromatina hasta la compactación del cromosoma metafásico. A partir de la fibra de 30 nm, se produce una fibra plegada de 300 nm con distintos dominios de la cromatina. Aparecen 6 dominios. Cada uno, en un plegamiento adicional no representado, es capaz de generar un cromómero. Los cromómeros agregados entre sí forman las bandas, que son puestas en evidencia a través de las técnicas de bandeamiento cromosómico.

estructurales y enzimáticas, en las características corticales e inmunológicas, en las propiedades nutricias y metabólicas, en la polarización y distribución de organelos y en las características proliferativas. Asimismo, consideraremos como manifestaciones de diferenciación nuclear a todos aquellos fenómenos que en el núcleo significan la expresión diferencial del mensaje genético que posee.

La diferenciación nuclear implica: a) la descondensación o condensación de cromosomas completos o de segmentos específicos de ellos, en relación con la posición de los genes que la célula requiere o no expresar, b) la aparición de RNP o productos nucleares asociados a sectores de cromatina descondensada, lo que tiene relación con la transcripción de los genes que están activos, c) un desarrollo nucleolar en concordancia con la demanda celular por ribosomas, d) una abundancia de complejos de poro consistente con el mayor o menor intercambio molecular núcleo-citoplasmático, y e) un volumen nuclear que se relacione con la fase del



Ciclo Celular en que la célula se encuentra, y con el grado de condensación diferencial de la cromatina que contenga.

Estas variaciones en la morfología y estructura nucleares son bastante generales. Sin embargo, en su conjunto, ellas producen una fisonomía o feno-

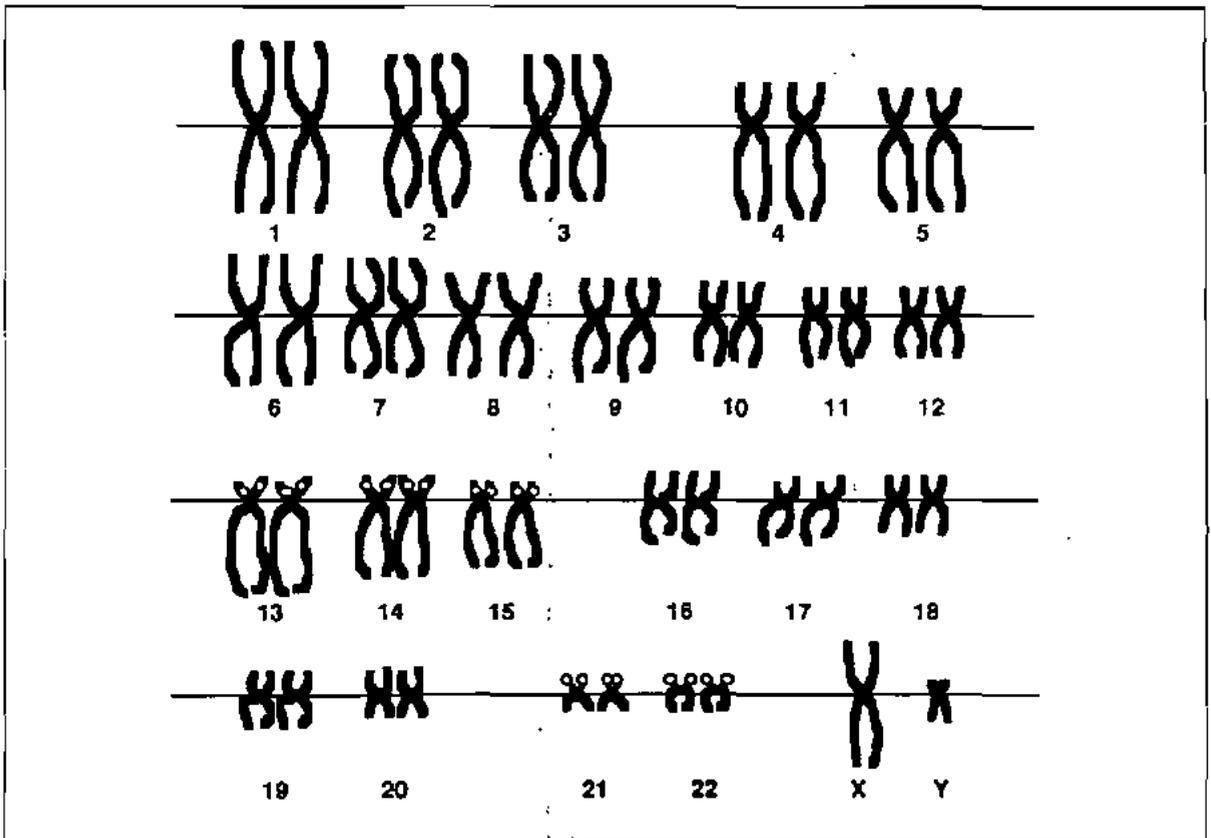


Figura 15. Cariotipo humano. En una célula diploide los cromosomas que constituyen pares homólogos tienen la misma morfología, con excepción del par cromosómico sexual XY de los varones. A partir de la fotografía de una placa metafásica, los cromosomas mitóticos son ordenados en pares homólogos de acuerdo a su morfología y tamaño. Al conjunto de cromosomas ordenado convencionalmente se le llama cariotipo. En la figura se muestra un cariotipo de un varón normal (46, XY). Los pares cromosómicos 13, 14, 15, 21 y 22 son nucleolares, tienen en sus brazos cortos los genes ribosomales.

Figura 14. *Morfología cromosómica.* Según la localización del centrómero a lo largo del cromosoma, este adquiere diferentes morfologías según la relación de tamaño entre sus brazos, independientemente de la longitud absoluta del cromosoma. Se puede expresar la localización del centrómero como una razón r , que resulta del cociente entre las longitudes del brazo largo y del brazo corto. M: cromosoma metacéntrico o con el centrómero en posición medial, ambos brazos cromosómicos tienen igual longitud ($r = 1$); m: cromosoma metacéntrico con el centrómero en posición mediana, ambos brazos cromosómicos tienen similar longitud ($r = 1,1-1,7$); sm: cromosoma submetacéntrico o con el centrómero en posición submedial, se distingue claramente un brazo largo y uno corto ($r = 1,8-3,0$); st: cromosoma subtelocéntrico o con el centrómero subterminal, el brazo corto es aún más pequeño aumentando el valor de r ($r = 3,1-7$); t: cromosoma telocéntrico o con el centrómero en posición terminal, el brazo corto es muy pequeño ($r = 7,1-$); T: cromosoma telocéntrico o con el centrómero en posición terminal, un brazo es inexistente (r es infinito).

tipo nuclear, que es característico de cada población celular. A este respecto, resulta ilustrativo señalar que, desde las primeras observaciones citológicas, las características microanatómicas del núcleo fueron importantes en la individualización de un tipo celular particular. El fenotipo nuclear se correlaciona positivamente con los cambios en la proporción de algunos de sus constituyentes macromolecula-

res. En efecto, de núcleos de diferentes fenotipos se pueden rescatar productos génicos que, a nivel molecular, son altamente específicos en su calidad y cantidad.

Territorios nucleares

Paulatinamente se ha ido conociendo la organización interna del núcleo. Sin embargo, aún no se

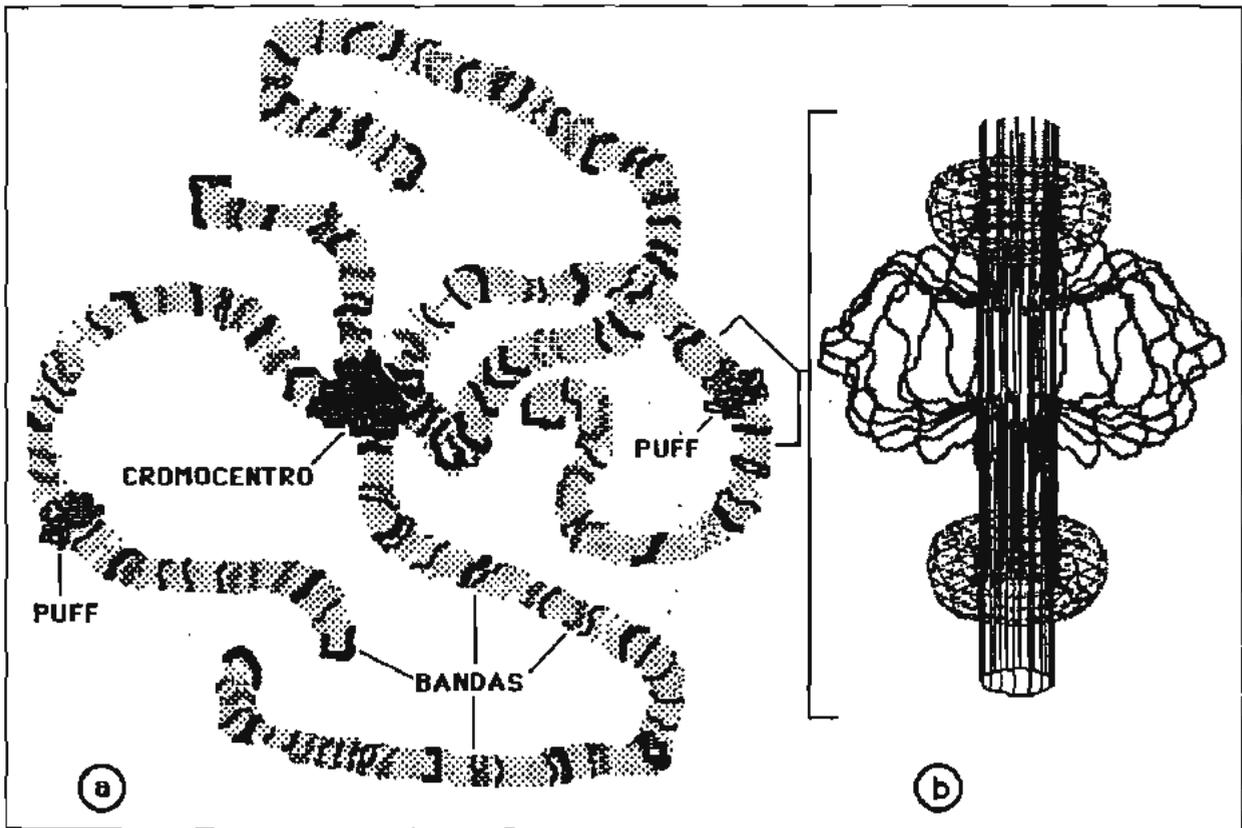


Figura 16. *Cromosomas politénicos.* Cromosomas gigantes de *Drosophila* (a), unidos entre sí por sus heterocromatinas pericentroméricas que forman un cromocentro. A lo largo de cada cromosoma es posible apreciar *bandas* transversales claras y oscuras que corresponden al patrón cromomérico natural de estos cromosomas. Algunas bandas se descondensan, expandiéndose a un diámetro mayor que el del promedio de 5 μ m de un cromosoma politénico. Tales sitios son los "puff" cromosómicos, en los cuales se ha demostrado que existe una intensa actividad transcripiva. b) Se detalla un segmento de uno de los cromosomas politénicos, compuesto por un paquete de numerosas fibras de cromatina en el que se observa un puff entre dos bandas oscuras. Cada banda oscura es equivalente a la superposición de los cromómeros de las 1000 a 2000 fibras de cromatina que componen al cromosoma politénico. Un puff corresponde a la expansión o descondensación de parte o de todos los cromómeros de una banda alcanzando a veces un diámetro de aproximadamente 10 μ m.

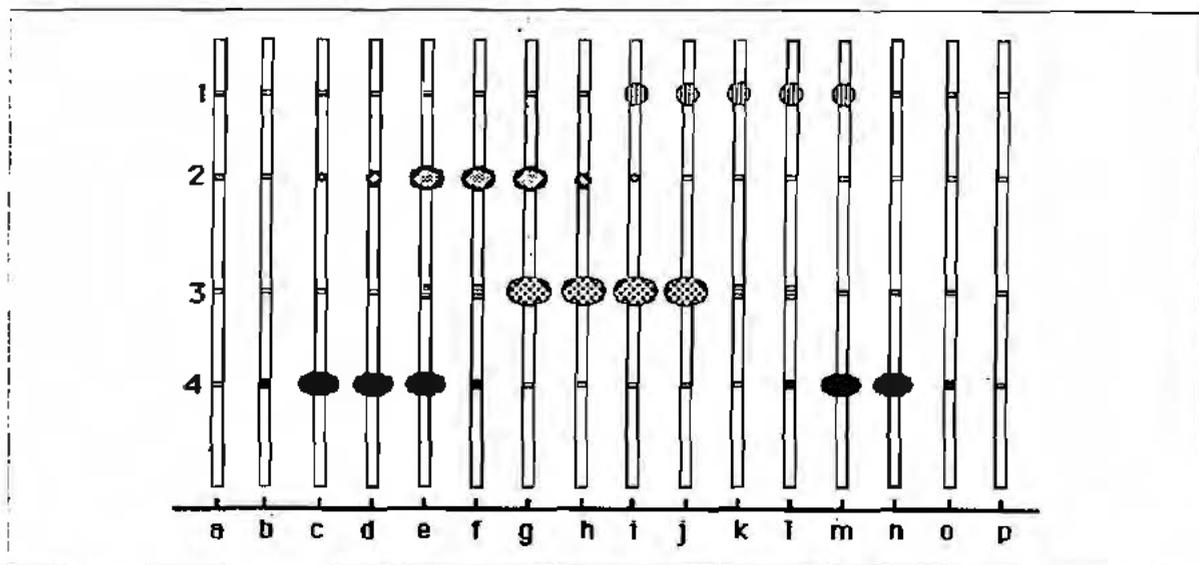


Figura 17. Expresión génica diferencial. Activación y desactivación de 4 bandas del mismo cromosoma politénico (a-p) en distintos momentos del desarrollo larvario en *Drosophila*. En a las 4 bandas señaladas a lo largo del cromosoma permanecen como tales. En b se activa la banda 4, que produce un puff en c, d y e, para luego desactivarse en f. La misma banda se reactiva en i y permanece así hasta o. En d, e e i se inicia la activación secuencial de las bandas 2, 3 y 1, que producen puffs, que se desactivarán luego en h, k y m, respectivamente. En cada una de estas fases del desarrollo, el cromosoma presenta un patrón de actividad génica característico, lo que se traducirá en la presencia de proteínas cualitativa y cuantitativamente diferentes (Becker, *Chromosoma* 10: 654-78; 1959).

entiende claramente cómo se distribuyen los cromosomas individuales en el espacio nuclear. Se ha propuesto la hipótesis que los cromosomas conservarían la polarización de Rab1, es decir, las regiones centroméricas de los cromosomas estarían agrupadas en un hemisferio nuclear, y las teloméricas se dispondrían en el hemisferio opuesto. Esta proposición se ha basado en la reiterada observación de polarización cromosómica en núcleos interfásicos, y en el inicio de la división mitótica, en todo semejante a la forma en que los cromosomas se presentan en la telofase. Se ha propuesto también que los cromosomas homólogos ocuparían sectores vecinos o próximos entre sí dentro del núcleo, característica que es muy frecuente en organismos con pocos cromosomas.

Sin embargo, en experimentos recientes, en que se han empleado sondas de DNA marcado, capaces de reconocer sectores cromosómicos específicos, se ha demostrado que tanto la polarización de Rab1 como la proximidad de los homólogos, no están necesariamente presentes en todos los tipos nucleares. A este respecto, parece claro que existen territorios nucleares donde se ubica cada cromosoma. Esta disposición se mantiene en un mismo tipo celular, siendo diferente en otros tipos celulares del mismo individuo.

Es posible que las relaciones funcionales, y las interacciones que se producen entre segmentos cro-

mosómicos localizados en proximidad, tengan una importante relación con la diferenciación nuclear. Obviamente, el número y morfología de los cromosomas de una célula serán factores determinantes en la distribución que éstos puedan tener dentro del núcleo, y en las posibles interacciones que entre diferentes dominios de cromatina se establezcan. Por ejemplo, se conoce muy bien que las regiones de heterocromatina constitutiva de diferentes cromosomas tienden a asociarse, formando cromocentros o sectores de cromatina condensada central en el núcleo. Asimismo, los cromosomas nucleolares, cuando son múltiples, tienden a asociarse a través de sus cromatinas NOR, las que se reúnen en la producción de un nucléolo común. Esta situación ha sido observada frecuentemente en células humanas, las que poseen cinco pares de cromosomas nucleares.

Expresión de los genes

Uno de los modelos que más ha permitido avanzar en la comprensión de la expresión génica diferencial ha sido el de las glándulas salivales de larvas de dípteros. Estos órganos larvarios están compuestos por unas pocas células de grandes dimensiones, en las que se organizan cromosomas gigantes, que exceden en mucho al tamaño de un cromosoma somático corriente. Su gran tamaño se debe a que los cromosomas homólogos, que están apareados (apareamiento somático) a través de sucesivas en-

domitosis han experimentado múltiples duplicaciones, sin posterior separación de los cromosomas resultantes. Cada uno de los pares cromosómicos de *Drosophila melanogaster* queda así constituido por un paquete de aproximadamente 2000 fibras de cromatina, las que al conservar su carácter cromómico, dan origen a bandas transversales claras y oscuras, y que tienen un patrón regular y hereditario (Figura 16a).

El estudio cuidadoso de estos cromosomas ha permitido establecer mapas de ellos, y correlacionar sus bandas con determinadas funciones génicas. Cuando en alguna de las bandas de estos cromosomas se desencadena la transcripción, la banda se expande, formando los llamados "puffs" cromosómicos o *anillos de Balbiani* (Figura 16b). Allí, junto con la descondensación de la cromatina, ocurre una activa síntesis de RNA.

Asimismo, el cese de la transcripción va seguido de la resolución del puff y del retorno de la cromatina involucrada a un estado condensado. En estos cromosomas fue posible estudiar la activación y desactivación de los puffs en el tiempo, y correlacionar tal fenómeno con distintos productos génicos y con diferentes estados del desarrollo de larvas de *Drosophila melanogaster*. Así se logró establecer que los puffs seguían un orden temporal de activación y desactivación, que era propio de cada especie. Asimismo, se observó que algunos puffs permanecían activos por mucho tiempo, mientras otros tenían una corta vida, pudiendo reactivarse nueva-

mente en el transcurso del desarrollo de la larva (Figura 17). Estos cambios morfológicos se correlacionaron positivamente con los RNA que posteriormente se aislaron desde los diferentes tipos celulares de la glándula. Así, los RNA eran cualitativamente diferentes y específicos, según la localización de los puffs en los cromosomas. Este interesante sistema celular puso de manifiesto la validez de la teoría de la expresión génica diferencial.

Es razonable suponer que activaciones y desactivaciones génicas ocurran en forma análoga en otros sistemas celulares eucariontes. Aunque no nos hemos referido a los posibles estímulos que desencadenan la activación de un cromómero, o de un gen, es posible imaginar que la funcionalidad genética de los sistemas eucariontes está basada, en gran medida, en la capacidad que éstos tienen de regular la expresión de sus genes y no en poseer un mayor número total de ellos.

BIBLIOGRAFIA

1. De Robertis y De Robertis h: *Biología Celular y Molecular*. 10^{ra} ed. Buenos Aires: Editorial El Ateneo 1981
2. Wolfe SL: *Biology of the Cell*. 2^{da} ed. USA: Wadsworth Publishing Co 1981
3. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD: *Molecular Biology of the Cell*. New York, London: Garland Publishing Inc 1983
4. Damell J, Harvey L, Baltimore D: *Molecular Cell Biology*. USA: Scientific Am Books 1986
5. Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM: *Molecular Biology of the Gene*. Vol II. 4^{ta} ed. USA: The Benjamin-Cummings Publishing Co Inc 1987

INDICE

PREFACIO	2	FISIOLOGÍA DEL NUCLEO	9
INTRODUCCIÓN	3	Transcripción	9
Sistema nuclear eucarionte	3	Ribonucleoproteínas (RNP)	10
MATERIAL HEREDITARIO	4	Transporte nuclear	11
Cromatina	4	Nucléolo	12
DNA e histonas	5	DIVISIÓN DE LA CÉLULA	13
Fibra nucleosómica	6	Ciclo proliferativo	13
Heterocromatina	7	Replicación del DNA	13
ESTRUCTURA DEL NUCLEO	7	Mitosis	16
Envoltura nuclear	7	Cromosomas	18
Complejos de poro	7	DIFERENCIACIÓN DEL NUCLEO	19
Matriz nuclear	8	Fenotipo nuclear	19
		Territorios nucleares	20
		Expresión génica diferencial	21

Centro de Extensión Biomédica

Destinado a difundir y transferir el conocimiento biomédico generado en las unidades académicas de la Facultad de Medicina o en otros organismos. Su objetivo específico es contribuir a mejorar el nivel de información científica y humanista de sus académicos y estudiantes, y de la comunidad nacional en general. La presente Serie Científica constituye una parte de estas actividades.

SERIE CIENTIFICA BASICA

Actualiza temas generales del área a un nivel básico. Son pequeños fascículos de bajo costo, dirigidos a alumnos universitarios, profesionales del área biológica, y público interesado. Los autores generalmente tienen gran experiencia o son especialistas en el tema respectivo.

SERIE CIENTIFICA AVANZADA

Actualiza temas avanzados en las distintas disciplinas biomédicas y biológicas. Son fascículos más extensos, aunque de bajo costo, y diseñados para alumnos universitarios avanzados, de postgrado, o profesionales en especialización. Los autores son profesores expertos o investigadores que han realizado contribuciones originales en su campo de trabajo.

OTROS TITULOS

1. Enfermedades de transmisión sexual (generalidades).
2. Enfermedades de transmisión sexual (virus).
4. Cariotipo y anomalías cromosómicas humanas.
5. Origen y evolución de la especie humana.

AUTORES DE ESTE NUMERO

- Prof. Soledad Berríos del Solar. Profesor Adjunto, Unidad de Citogenética, Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Su línea de investigación incluye la ultraestructura de cromosomas mitóticos y meióticos, y la localización inmunocitoquímica de proteínas nucleares.
- Dr. Raúl Fernández Donoso. Profesor Titular, Unidad de Citogenética, Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Trabaja actualmente en la distribución de dominios cromosómicos en el meiocito de mamíferos, y en modelos probabilísticos de arquitecturas nucleares.

EDITORES GENERALES

Drs. Angel Spotorno O., y Rafael Blanco C. Profesores Asociados, Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

EDITOR ASOCIADO

Prof. Remigio López Solís. Profesor Asociado, Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Material Complementario

Trabajo Práctico
Lunes 16 de Enero de 2006

“Uso de Multimedia para el aprendizaje de la Genética”

Profesor: MANUEL SANTOS

PRACTICO N° 1

USO DE MULTIMEDIA PARA EL APRENDIZAJE DE LA GENÉTICA

Prof. Manuel Santos (msantos@bio.puc.cl)
Bioqco. Andrés Toro

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se cuenta con numerosos programas computacionales de Multimedia, que facilitan el aprendizaje de los conceptos básicos y aplicados de la Genética. El acceso cada día más mayoritario a información genética a través de INTERNET, debiera ser ampliamente conocido por los alumnos de las enseñanza media.

II. OBJETIVOS

- 1.- Conocer la metodología de búsqueda de información genética básica y aplicada a través de INTERNET.
- 2.- Discutir acerca de las ventajas y limitaciones que tiene la búsqueda de información genética a través de INTERNET.
- 3.- Conocer la metodología para utilizar algunos programas Multimedia relacionados con la disciplina de la Genética: Programas en CDs: "Hypercell" , "Molecular Cell Biology" y "Freeman's Genetics 2.0 (Griffiths) y programas disponibles en la red "Hands on genetics"
- 4.- Discutir acerca de las ventajas y limitaciones que tiene el uso de programas Multimedia relacionados con la disciplina de la Genética.

III. ACTIVIDADES

- 1.- **Búsqueda de información genética a través de Internet:** división celular, cariotipo y Proyecto Genoma Humano.

Direcciones:

- Human Genome Project Information
<http://www.ornl.gov/hgmis/home.html>
http://www.nhgri.nih.gov/educationkit/index_cont.html
- Recursos para aprender Genética
<http://www.biologia.arizona.edu/cell/cell.html>

2.- Búsqueda de información bibliográfica de genética a través de Internet:

buscar información sobre alguna enfermedad genética específica

a) PUBMED:

<http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>

b) Human Genome project Information

<http://www.ornl.gov/hgmis/home.html>

c) OMIM (On line Mendelian Inheritance in Man)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

d) Scirus

<http://www.scirus.com>

3.- Metodología del Programa Multimedia "Molecular Cell Biology"

Observar: Video: Mitosis

Animaciones: Estructura tridimensional de la cromatina

Técnicas: Clonamiento de plásmidos

4.- Metodología del Programa Multimedia "Freeman's Genetics 2.0 (Griffiths)"

Observar: Mitosis y Meiosis

Meiotic recombination.

Mechanism of crossing over

5.- Metodología del Programa Multimedia "Hypercell"

Observar: Técnicas: PCR

6.- Metodología del Programa Multimedia "Hands on genetics"

Ingresa a <http://www.handsongenetics.com>

Acceda a "Hands-on approach to meiosis"

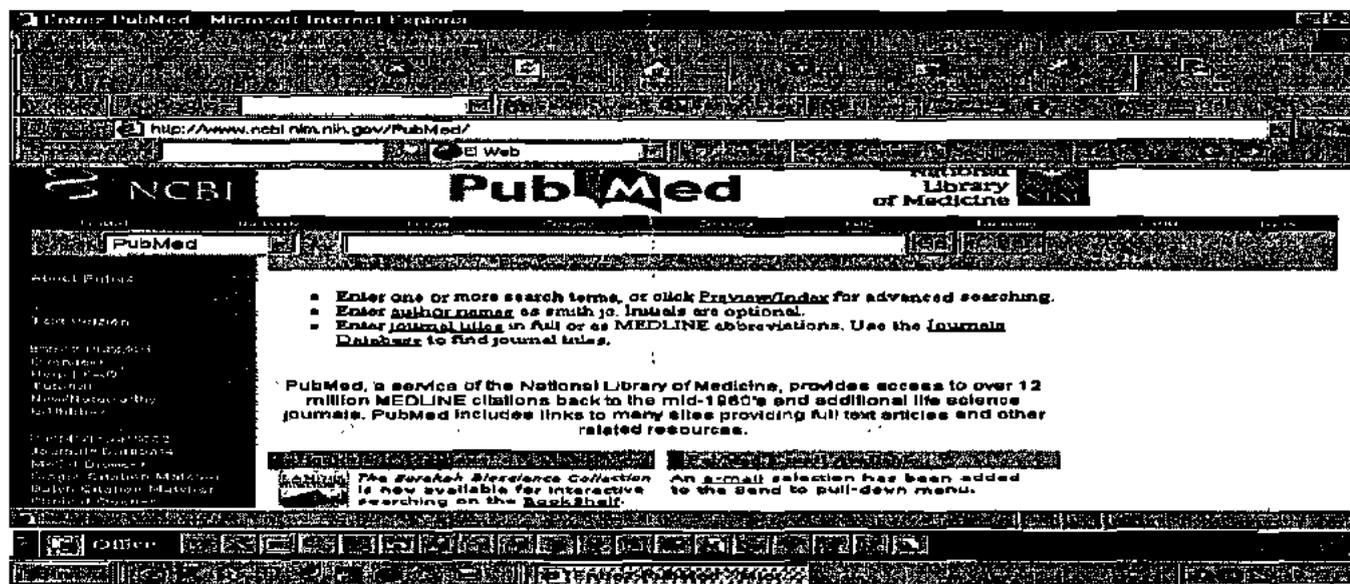
INSTRUCCIONES MINIMAS DEL USO DE INTERNET

- 1.- haga un doble click con el mouse en el ícono **NETSCAPE (INTERNET)**
- 2.- una vez dentro del programa **NETSCAPE**, puede utilizar varias formas de buscar información. Cada vez que el programa esté accionándose, se verá una lluvia de meteoritos en el extremo superior derecho.

Ejemplos de búsquedas de información genética:

- a.- utilizando el comando **NETSEARCH** (búsqueda en la red)
 - presione el comando **NETSEARCH**
 - seleccione algún servidor de búsqueda: **LYCOOS**, **INFOSEEK** u otros
 - tipee, en el casillero que muestra el cursor, las palabras claves de la búsqueda y haga click en **SEARCH** (búsqueda)
 - para ver los documentos encontrados, haga un click sobre el documento destacado (cursor con mano)
 - para volver al menu, haga un click en comando **BACK** (atrás)
 - b.- utilizando direcciones conocidas, del tipo **http**
 - localice el cursor en la dirección Location: **http:// ...** y borre la dirección que aparece
 - tipee cuidadosamente la dirección a buscar
ej: **http://www.puc.cl**
 - c.- utilizando direcciones preseteadas en el "**BOOKMARKS**"
 - haga un click en el comando "**BOOKMARKS**"
 - localice una dirección preestablecida con el cursor, sosteniendo presionado el botón
 - haga un click en la dirección encontrada
- 3.- **IMPRIMIENDO** la información encontrada
 - haga un click en el comando **PRINT** (imprimir)
 - seleccione la opción adecuada y haga click
 - 4.- **GUARDANDO** ("saving") la información encontrada en diskette
 - haga un click en el comando **FILE** (archivo) y luego accione la opción **SAVE AS** (guardar como)
 - dar nombre al archivo (hasta 8 caracteres) con extensión **.txt** (texto) o **.doc** (documento)
 - 5.- Para salir del programa **NETSCAPE**
 - haga un click en el comando **FILE** (archivo) y luego accione la opción **QUIT** (salir)

Base de datos desarrollada por NCBI y la National Library of Medicine, USA. Permite recuperar información desde el año 1950. Se actualiza diariamente. Contiene aproximadamente 14 000 000 referencias bibliográficas de artículos del área biomédica.



Acceso

Libre en Internet en página web: <http://www.puhmed.gov>

Cómo buscar

Búsqueda por texto libre:

Ingrese la palabra clave en la Caja de Búsqueda y presione GO. Obtendrá referencias que contengan la palabra en cualquier campo del registro. Se pueden combinar las palabras usando AND, OR, NOT, NEXT Y NEAR. Puede truncarse un término usando asterisco para recuperar todas las palabras de la misma raíz. Ejemplo: Al colocar *child** recuperará los términos *child, children, childhood, etc.*

Visualización de los resultados

Una vez realizada la búsqueda, en el ícono **SUMMARY** están las opciones de formato de presentación de los registros. (autor, título, año, volumen, páginas). Las referencias pueden seleccionarse haciendo un click en el cuadrado ubicado al lado izquierdo. Con **DISPLAY** recuperará sólo lo seleccionado. Al lado izquierdo de cada referencia un ícono en forma de libro indica si incluye abstract y si se puede acceder al texto completo. Al lado derecho la opción **related articles** despliga un listado de artículos relacionados.

Límites para la búsqueda: Ingrese al ícono **LIMITS** que aparece en el Menú Principal, para seleccionar los límites que aplicará para refinar su búsqueda. Seleccione y luego vaya a la opción **GO** ubicada al lado derecho de la caja de búsqueda.

All Fields	<input type="checkbox"/> only items with	<input type="checkbox"/> only items with abstracts	Publication Types
Languages	Subsets	Ages	
Human or Animal	Gender	Entrez Date	Publication Date
From		To	

Use the format YYYY/MM/DD; month and day are optional.

La búsqueda por título de revistas debe ser por su abreviación. Las abreviaciones se pueden obtener en página principal de PubMed en el ícono **JOURNAL BROWSER**.



Uso del MESH

El Medical Subject Headings (MeSH) es el vocabulario controlado usado por Medline, que permite realizar búsquedas más específicas. Ingrese a la opción **MESH BROWSER** a la izquierda de la pantalla principal.

Introduzca el término en la Caja de Búsqueda y presione **GO**. Aparecerá una lista de materias relacionadas con la palabra clave. Seleccione un término y presione el icono **browse this term**. Aparecerá una pantalla con la definición y el árbol del término (estructura jerárquica).

- Se puede agregar un calificador asociado al término si lo considera necesario. Luego presione el icono **SEND TO** para ejecutar la búsqueda. Aparecerá lo seleccionado en un cuadrado de búsqueda.
- Si desea hacer la búsqueda por el término sin calificadores presione el icono **SEND TO** que aparece debajo de la definición. Aparecerá una ventana con el término en un cuadro de búsqueda, donde se puede combinar con otros términos MESH usando **and**, **or**, **next** o **near** o buscar solo por el término.

Para agregar otro término se debe colocar en la Caja de Búsqueda y presionar el icono **SEARCH** (seleccionando el operador booleano al lado del icono previamente). Para ejecutar la búsqueda presione el icono **PUBMED SEARCH** que aparece debajo.

Re-Utilizando la estrategia

Se debe hacer click en el icono **HISTORY** del menú. Permite acceder a las búsquedas realizadas anteriormente en una misma sesión. Cada búsqueda se almacena con número, los cuales se pueden usar para repetir una búsqueda realizada o para combinar varias búsquedas usando los operadores booleanos.

Para Usar Filtros

Hacer click en el icono **CLINICAL QUERIES** que aparece en el Menú de la izquierda en la pantalla principal. Aparecen dos opciones:

La primera denominada **Clinical Queries using Research Methodology Filters** con la que se puede limitar la búsqueda a las categorías de tratamiento, etiología, pronóstico y diagnóstico y definir el énfasis de la búsqueda en sensibilidad o especificidad.

La segunda denominada **Systematic Reviews** permite limitar la búsqueda a las revisiones sistemáticas y los metaanálisis.

Después se coloca el término en la Caja de Búsqueda que aparece debajo y se oprime el icono **GO**.

Completar Referencias

Hacer click en el icono **SINGLE CITATION MATCHER** que aparece en el Menú de la izquierda en la pantalla principal. Puede completarse una referencia con cualquiera de los datos que aparecen en el formulario de búsqueda.

Descarga e impresión de la información

Para ejecutar cualquiera de estas opciones hay que tener seleccionadas las referencias previamente y haber definido su forma de visualización con el icono **DISPLAY**.

Para grabar presione el icono **SAVE** que aparece en el Menú Principal, de esta forma se pueden grabar los registros seleccionados.

Para imprimir utilice la opción del visualizador de Internet, que aparece en el icono **ARCHIVO**.

Para salir

Abrir ventana **File** o **Archivo** del visualizador de Internet y hacer clic en **Exit** o **Salir**.

Si necesita ayuda solicítela a los bibliotecarios referencistas.

Estimado Usuario: Quisiéramos recordarle que el uso de las Bases de Datos disponibles en Referencia es hasta media hora por persona.



Q & A: corresponde a distintos test para cada capítulo, para probar los conocimientos adquiridos durante el estudio de ellos.

Classic Experiments: aquí se encuentran explicados, los experimentos clásicos y fundamentales para el desarrollo de la ciencia, en forma de texto con figuras o tablas explicativas.

Practice MCAT/GRE: corresponde a una prueba tipo MCAT o GRE que son las pruebas exigidas para postular a posgrados internacionales.

Companion Website: contiene un link para acceder al sitio web del MCB.

AYUDA:

Al acceder a los videos o a las distintas secciones del CD, pueden verse en la parte inferior de la pantalla, que aparece un texto **PATHFINDING**, al hacerle click se accede a un menú que muestra las últimas secciones consultadas para un acceso rápido a ellas.

Las animaciones pueden verse de 2 modos distintos, seleccionando el modo en la parte superior derecha de la pantalla, con **Step-through** se ve la animación paso a paso, mientras que con **Continuous**, puede verse en forma continua. Algunas animaciones poseen audio en el cual se explica lo que se muestra en la animación, pero sólo funciona cuando se ven en el modo continuo. También aparecen cuadros en el extremo superior izquierdo de la pantalla que llevan a figuras relacionadas con el tema de la animación. Por último, aparece un nuevo texto en la parte inferior de la pantalla **Media Connections**, el cual muestra más videos o animaciones relacionados con el tema.

MOLECULAR CELL BIOLOGY 4.0 (MCB)

El tema esencial de este programa es, como su nombre lo indica, la Biología molecular de la célula. Consta de esquemas, animaciones, explicaciones en inglés, capítulos de preguntas y acceso a la página web del MCB.

Es la cuarta versión, año 2000, de WH Freeman and Company, viene con el libro de Lodish y colaboradores "Molecular Cell Biology".

Para consultar :

Una vez instalado el programa desde el CD, buscar en el menú Inicio la carpeta llamada "MCB 4.0 - Student" y dentro de ella ejecutar el programa haciendo click en el acceso directo llamado "MCB 4.01". Luego de la presentación, aparecen en la parte inferior 2 textos activos "MAIN MENU" con el que se accede al menú principal, que corresponde a la foto y "CREDITS" el cual lleva a una página que contiene información de la gente que participó en la creación de este CD.

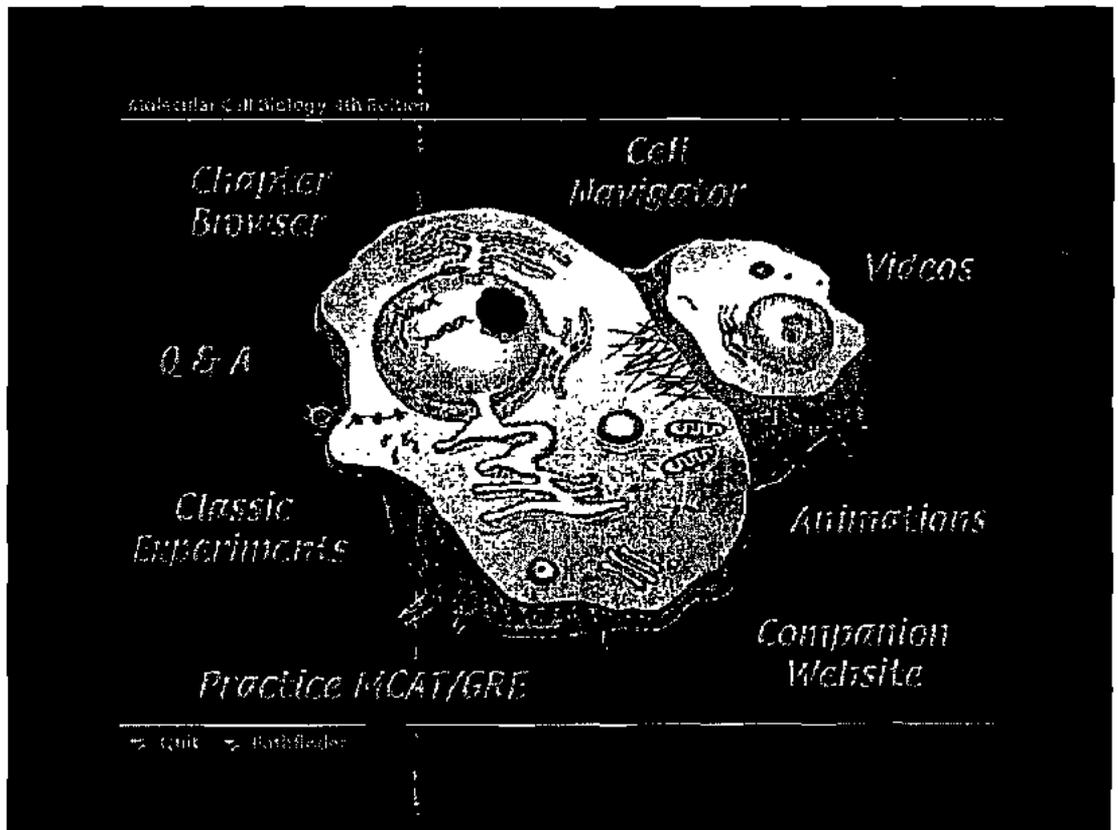
MENÚ PRINCIPAL (MAIN MENU):

Cell Navigator: lleva a un menú en el cual pueden accederse a los distintos procesos que ocurren dentro de la célula, su interacción con elementos externos y el funcionamiento de los distintos organelos subcelulares.

Videos: aquí pueden encontrarse todos los videos presentes en el CD.

Animations: aquí se encuentran todas las animaciones presentes en el CD.

Chapter Browser: Aquí se muestran los contenidos del CD separados por capítulos.



FREEMAN GENETICS 2.0

Los temas que componen este CD están relacionados con algunos conceptos básicos de genética, así como algunas técnicas utilizadas en la actualidad para el estudio de esta rama de la biología. El programa cuenta con esquemas, figuras, animaciones y explicaciones en inglés.

Para consultar:

Una vez instalado el programa desde el CD, buscar en el menú Inicio la carpeta llamada "Freeman Genetics 2.0 - Student" y dentro de ella ejecutar el programa haciendo click en el acceso directo llamado "Freeman Genetics 2.0". Luego de la presentación, aparecen en la parte inferior 2 textos activos: "Menú", con el cual se accede al menú principal, que corresponde a la foto, y "Credits", el cual lleva a una página que contiene información de la gente que participó en la creación de este CD.

FREEMAN GENETICS 2.0	INTRODUCTION TO GENETIC ANALYSIS
CHAPTER 3 3-1 Three-Dimensional Structure of Nuclear Chromosomes 3-2 Mitosis 3-3 Meiosis	CHAPTER 12 12-1 Finding Specific Cloned Genes by Functional Complementation 12-2 Polymerase Chain Reaction
CHAPTER 4 4-1 Interaction Between Alleles at the Molecular Level	CHAPTER 14 14-1 Oligonucleotide Chips
CHAPTER 5 5-1 Meiotic Recombination	CHAPTER 16 16-1 UV-Induced Photodimers and Excision Repair 16-2 Molecular Mechanism of Mutation: The Streisinger Model
CHAPTER 8 8-1 DNA Replication	CHAPTER 17 17-1 Chromosome Rearrangements: Paracentric Inversion 17-2 Chromosome Rearrangements: Reciprocal Translocation
CHAPTER 10 10-1 Transcription 10-2 Translation 10-3 Nonsense Suppression at the Molecular Level	CHAPTER 18 18-1 Meiotic Nondisjunction
CHAPTER 11 11-1 Regulation of the Lactose System in <i>E. coli</i>	CHAPTER 19 19-1 A Mechanism of Crossing-Over
QUIT	

MENÚ PRINCIPAL (MAIN MENU)

Capítulo 3 (Chapter 3): este capítulo incluye información sobre como se ordenan las moléculas de ADN, presentes en el núcleo de la célula, con diversas proteínas y así dar origen a los cromosomas. También posee animaciones que explican los procesos de mitosis y meiosis.

Capítulo 4 (Chapter 4): este capítulo presenta animaciones e información sobre como los alelos de un gen en particular, pueden interactuar a nivel molecular.

Capítulo 5 (Chapter 5): este capítulo muestra animaciones que ayudan a entender el proceso de recombinación meiótica.

Capítulo 8 (Chapter 8): este capítulo posee información y animaciones sobre la replicación del ADN, incluyendo desde la polimerización de nucleótidos hasta la replicación del cromosoma.

Capítulo 10 (Chapter 10): este capítulo contiene animaciones que explican los procesos de transcripción del ADN a ARN, traducción del ARN a Proteína, así como una explicación para el fenómeno de "supresión génica".

Capítulo 11 (Chapter 11): este capítulo muestra un ejemplo animado de la "regulación transcripcional en procariontes".

Capítulo 12 (Chapter 12): este capítulo presenta animaciones que ayudan a entender el concepto de "complementación génica" y la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction).

Capítulo 14 (Chapter 14): este capítulo describe mediante animaciones la reciente técnica de "oligonucleotide arrays", la cual es muy útil, por ejemplo, para determinar que genes se encuentran activos en una célula, bajo una condición particular de cultivo.

Capítulo 16 (Chapter 16): capítulo que presenta la forma en la cual la radiación UV causaría mutaciones en el ADN y el mecanismo de reparación presente en la célula. También se incluye una animación que explica como se producen mutaciones durante el proceso de replicación de la molécula de ADN.

Capítulo 17 (Chapter 17): capítulo que explica como se originaría un reordenamiento en la estructura de un cromosoma. Específicamente, se muestran animaciones para explicar los reordenamientos cromosómicos conocidos como "inversión" y "translocación".

Capítulo 18 (Chapter 18): en este capítulo se define lo que se entiende por "meiosis no disyuntiva, apoyándose en animaciones y breves notas.

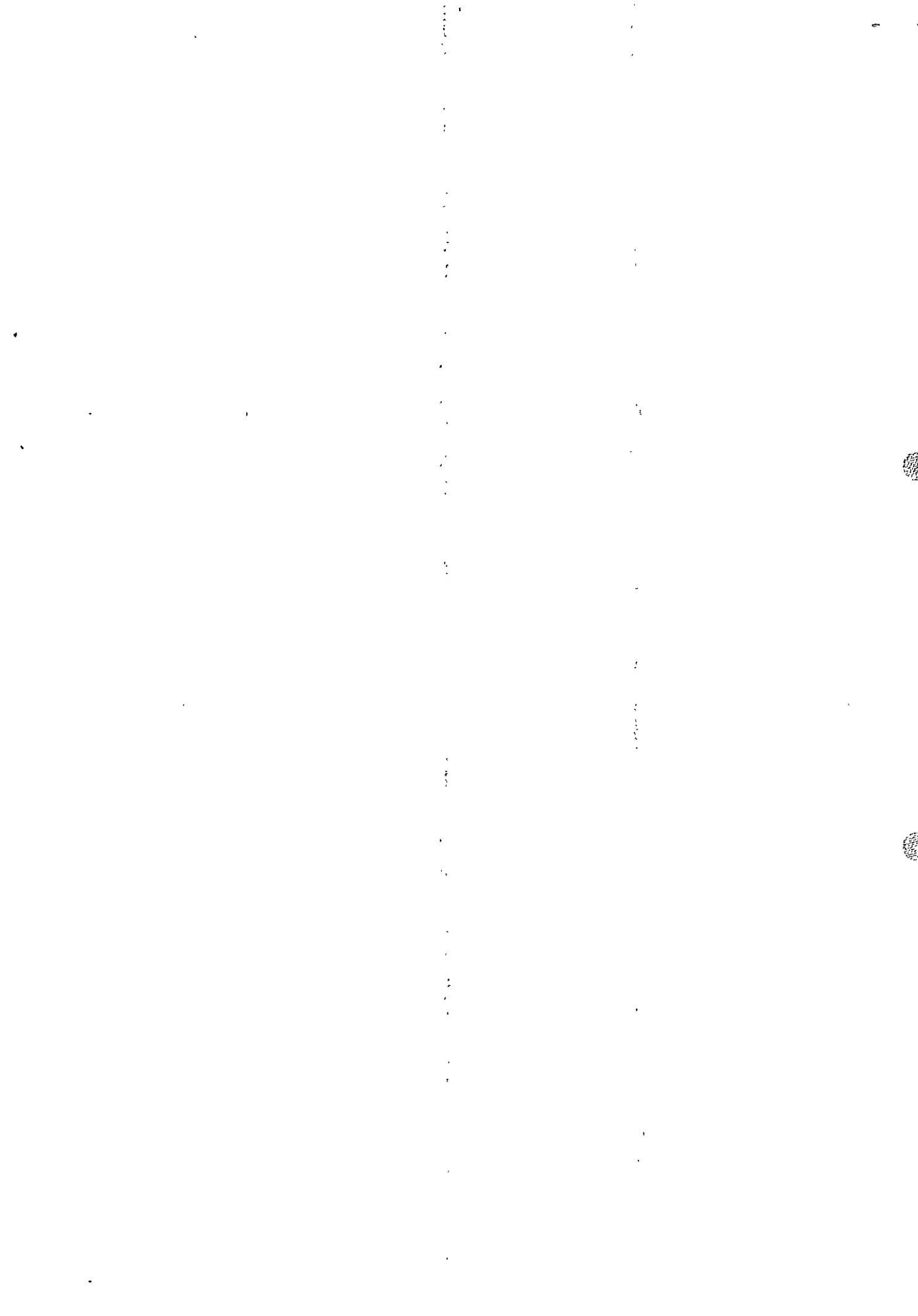
Capítulo 19 (Chapter 19): en este capítulo se encuentran animaciones que explican el mecanismo que permitiría el "crossing-over" entre cromátidas de cromosomas homólogos.

AYUDA:

Las animaciones se pueden ver de 2 modos distintos. Seleccionando el modo **“Step-by-Step”**, ubicado en la parte superior izquierda de la pantalla, se ve la animación paso a paso, mientras que con el modo **“Continuous”** puede verse en forma continua. Algunas animaciones poseen audio en el cual se explica con el cual se explica lo que se muestra en la animación, pero sólo funciona cuando se ve en el modo continuo. También se muestran cuadros en el extremo izquierdo de la pantalla, los que llevan figuras relacionadas con el tema tratado. En estos casos, la(s) animación(es) se presenta como un pequeño recuadro en la parte inferior de la pantalla. Para acceder a la animación, basta con hacer click con el cursor sobre el recuadro de la animación que se desea ver.

Por último, para volver al menú inicial o acceder a las animaciones presentes en los temas tratados en un capítulo, hay que hacer click con el cursor en la opción **“Main Menu”** o **“Topic”**, ambas desplegadas en el extremo inferior izquierdo de la pantalla.

Si necesita ayuda solicítela a los ayudantes.



HYPERCELL

Es un programa que funciona junto con un diskette que debe ser instalado en los computadores 8,11,14,17 de la sala multimedia. En los demás equipos funciona sin diskette.

El tema esencial de este programa es la célula. Sus partes, sus tipos, etc. Consta de esquemas, que tienen animaciones, y explicaciones en inglés. También tiene bibliografía y una extensa lista de definiciones de los términos relacionados.

Es una versión de 1997 de Garland Publishing.

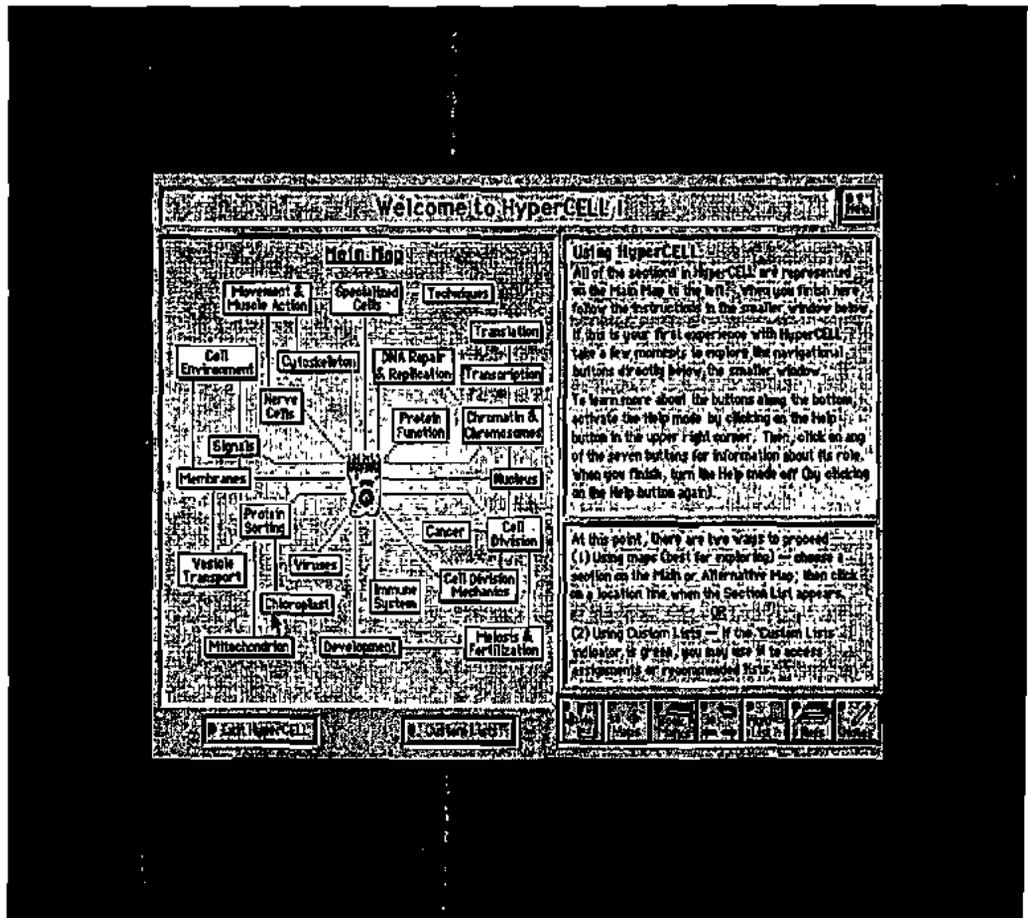
Para consultar :

Una vez que el diskette está instalado, desde la carpeta At ease, se va a la carpeta Aplicaciones, ahí hay un botón con una cámara de cine y dice "BEGINHC", se debe hacer un click en él y el programa comienza.

Todas las secciones de Hypercell están representadas en el Mapa Principal (Main Map) a la izquierda.

Si desea ver un tema en particular debe seleccionarlo, haciendo un click con el mouse (El tema seleccionado se pondrá de color amarillo).

Una vez dentro de un tema, la parte derecha de la pantalla cambiará. Se presentará una lista de los subtemas. Cada subtema tiene un indicador en forma de círculo que toma un color de acuerdo al tratamiento que se le ha dado durante el curso. Por ejemplo, si el círculo es transparente quiere decir que ese subtema no ha sido visto, si es gris quiere decir que se ha visto brevemente y si es verde que se ha visto más detalladamente. Los colores azul, rojo y amarillo deben ser activados por el usuario.





Ayudas:

Hay una botonera ubicada en el extremo inferior derecho de la ventana, el uso de los botones es el siguiente:

Movie: sirve para activar la animación en cada tema. Dentro de este botón están las opciones play, pausa y stop mostradas con sus respectivos iconos. Mientras la animación está activada, la ventana contiene una lista de los puntos principales. Se puede hacer click en cualquier punto para observar esa parte de la animación en particular. Para salir de movie, debe hacer un click dentro del botón.

Maps: sirve para volver al Menú Principal haciendo un click sobre el pequeño círculo amarillo ubicado en la parte derecha del botón, en la parte izquierda hay una zona azul que si es activada muestra un lista de lugares dentro del programa relacionadas con el tema en cuestión.

Go: sirve para avanzar o retroceder dentro de un tema a otro o dentro de un tema determinado.

Bookmarks: al activar este botón aparece un listado de los temas que han sido destacados por la persona que ve el programa. Se pueden agregar y borrar, si no son borrados quedan guardados para la próxima sección. Para salir de bookmarks debe desactivar el botón haciendo un click sobre éste.

Word List: al activar este botón se despliega una lista de términos relacionados, al ser seleccionados se despliega una definición. Para desactivar Word List debe hacer un click sobre el botón.

Referencias: este botón, al ser activado, despliega referencias bibliográficas para cada tema. Para desactivar haga un click sobre el botón.

Notes: este botón tiene la misma finalidad de un notepad.

Indicadores de los botones:

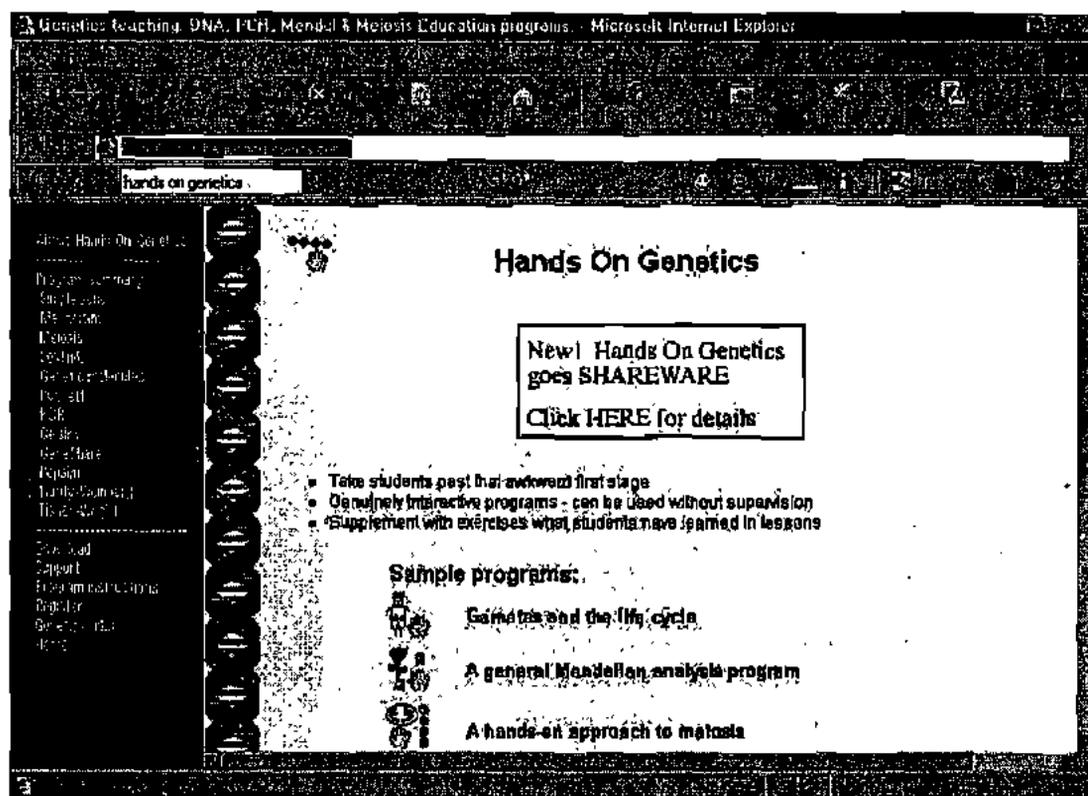
En los botones se encuentran pequeños indicadores en forma de círculo que toman distintos colores de acuerdo al uso que se ha hecho de cada botón durante el trayecto por el programa.

Si es gris se ha usado brevemente, si es verde ya se ha usado. Cuando el círculo se vuelve rojo significa que el botón está activado y que para continuar con otros temas debe desactivarlo.

Help: este botón se encuentra en el extremo superior derecho de la ventana, si este botón es activado, se puede consultar la ayuda para el uso de cada uno de los botones arriba descritos presionándolos de a uno y no soltándolos hasta que ya se haya obtenido la información requerida.

HANDS ON GENETICS es una compañía que produce software destinado a enseñar y a aprender genética. El set consiste en 12 programas que se ejecutan en forma independiente y cada uno cubre un área particular de la genética con múltiples ejercicios para facilitar el aprendizaje. Lamentablemente no son gratuitos, pero algunas versiones de evaluación pueden ser bajadas de su página web (<http://www.handsongenetics.com>). En ellas pueden verse algunas de sus funcionalidades, pero para acceder al software completo es necesario comprar la licencia.

Estos programas funcionan en Windows 95 o posterior y en Macintosh.



A continuación una breve descripción de cada uno de los programas (es recomendable que estos sean ejecutados en el orden aquí indicado):

1.- **SingleGene:** Introduce al estudiante los conceptos básicos de ciclos de vida, genética y herencia.

2.- **Mendelism:** Genética mendeliana.



- 3.- **Meiosis:** Ayuda a aprender las etapas de la meiosis, además muestra una breve comparación con la mitosis.
- 4.- **Sex link:** Muestra los principios de la herencia ligada al sexo.
- 5.- **Genetic Molecules:** Cómo se forman el ADN, ARN y proteínas.
- 6.- **Punnett:** Continuación de SingleGene, ahora se trabaja con 2 *loci*.
- 7.- **PCR:** La reacción en cadena de la polimerasa.
- 8.- **Gelsim:** Ejecuta una simulación de cortes con enzimas de restricción para conocer la secuencia de un plásmido.
- 9.- **GeneShare:** Permite a los estudiantes hacer y/o estudiar pedigrees.
- 10.- **PopSim:** Programa para estudiar genética de poblaciones.
- 11.- **Hardy-Weinberg:** El estudiante puede estudiar al ley de Hardy-Weinberg en un locus determinado.
- 12.- **Fisher-Wright:** Programa para estudiar la línea de descendientes en una población finita.

USO DE LOS PROGRAMAS:

El uso de estos programas es muy sencillo, sólo basta ejecutar el archivo que corresponde a cada programa y seguir las instrucciones en inglés que aparecen después de cada paso. Si necesita ayuda en su uso, en la misma página web de la compañía, en la sección "Program Instructions" puede encontrar archivos de ayuda en PDF tanto para estudiantes como para instructores o profesores.

Si necesita ayuda solicítela a la Bibliotecaria o al operador de la sala multimedia

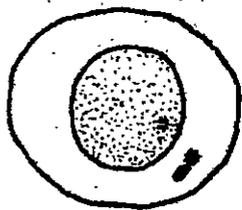
Material Complementario

Clase

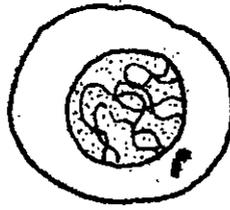
Martes 17 de Enero de 2006

“MEIOSIS Y VARIABILIDAD GENÉTICA”

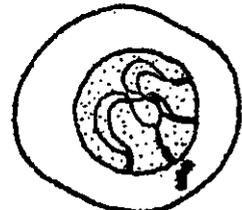
Profesora: SOLEDAD BERRIOS



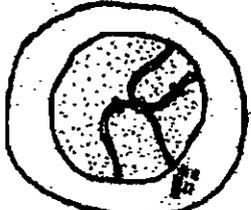
Interfase



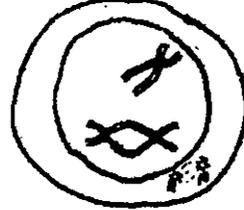
Profase I - Leptotano



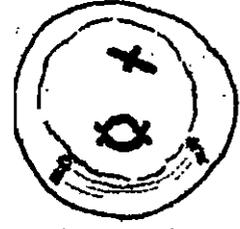
Zigoteno



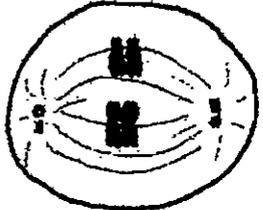
Paquiteno



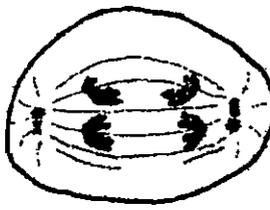
Diploteno



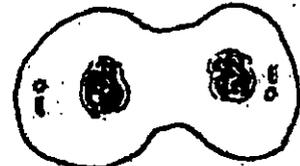
Diacinesis



Metafase I

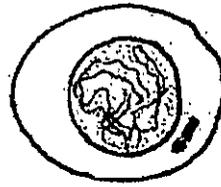
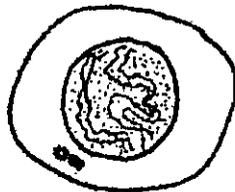


Anafase I

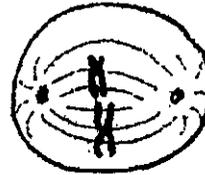
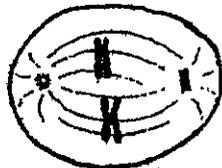


Telofase I

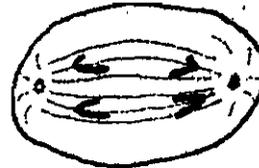
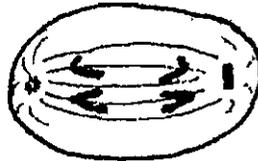
Profase II



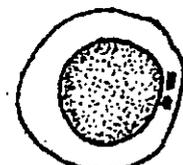
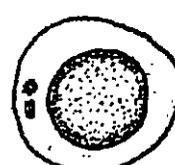
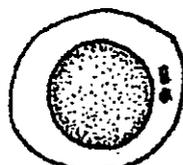
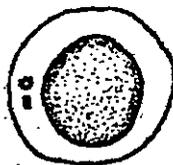
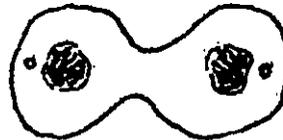
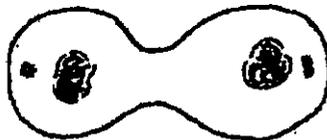
Metafase II



Anafase II



Telofase II



LA MEIOSIS

En la especie humana el momento en el cual ocurre la meiosis, así como las características que ella presenta, son propias al sexo del individuo. En efecto, la meiosis femenina se inicia en la embriogénesis, luego se detiene por años. Se reinicia en la pubertad y continua en forma cíclica hasta la edad madura. En cada ciclo un grupo de folículos comienza a madurar y sólo completarán la meiosis los que sean fecundados. En el varón, la meiosis se inicia después de la pubertad, y es continua a través de toda la vida adulta. En ambos sexos no sólo hay una gran diferencia en el tiempo de inicio de la meiosis, sino, es evidente que en el sexo femenino ésta es discontinua en el tiempo y en el sexo masculino continua.

La meiosis consta de dos divisiones celulares sucesivas precedidas de sólo una duplicación del DNA. Ello produce una reducción del número de cromosomas que van a estar presentes en las células resultantes, por lo que la meiosis también se conoce como reduccional. En contraste, la mitosis se considera ecuacional puesto que la distribución de los productos cromosómicos en las células hijas es equivalente al de las células originales.

Es importante comprender como se distribuyen y segregan los cromosomas en las dos divisiones meióticas para entender como se origina la haploidía de las células resultantes de la meiosis. Sin embargo, en la meiosis, y particularmente en toda la profase de la primera división meiótica ocurren una serie de otros fenómenos celulares tremendamente relevantes al éxito de la célula gamética final y a la variación genética de la cual ella es depositaria que también deben ser considerados. Por lo tanto le invitamos a revisar la meiosis considerándola como un proceso largo y complejo que sólo termina con las segregaciones cromosómicas y las divisiones celulares. A este respecto, y refiriéndonos sólo al tiempo que toma su ocurrencia, las dos divisiones demoran menos de 1 día, en cambio sólo la profase de la primera meiosis demora aproximadamente 7 días en los varones y hasta varios años en las mujeres.

La meiosis es un proceso que compromete al meiocito en forma integral, sin embargo, los cambios más destacados ocurren a nivel del núcleo, por lo que generalmente la descripción de la fenomenología meiótica está referida a los cambios nucleares o

cromosómicos. Entre éstos, los eventos más destacados que ocurren en la meiosis son: duplicación del DNA, sinapsis de los cromosomas homólogos, "crossing over", síntesis de RNA, segregación de cromosomas homólogos, segregación de cromátides, y divisiones celulares.

La meiosis se divide en etapas las que se denominan de la misma manera que las etapas mitóticas. Además se las numera con I o II dependiendo si corresponden a profase, metafase, anafase o telofase de la primera o segunda divisiones meióticas. A continuación se describen los principales acontecimientos de las distintas etapas de la meiosis comenzado por la profase I y sus subetapas. La profase I se subdivide en las siguientes 5 subetapas: Leptoteno o leptonema, zigoteno o zigonema, paquiteno o paquinema, diploteno o diplonema y diacinesis. La duplicación del DNA ocurre antes del inicio de la profase es decir es previa al estado de leptoteno.

En el **leptoteno** se aprecian finos filamentos dentro del núcleo; corresponden a la cromatina de cada cromosoma que se ordena en torno a un eje cromosómico. Cada eje cromosómico se encuentra unido por ambos extremos (o telómeros) a la envoltura nuclear.

En el **zigoteno**, los cromosomas homólogos, posiblemente situados en áreas próximas de la envoltura nuclear, se aparean y luego inician una unión más íntima y estable que se conoce como sinapsis y que generalmente ocurre por los extremos o telómeros. Estructuralmente, este fenómeno se visualiza debido a la formación del complejo sináptico o complejo sinaptonémico. Este cuerpo protéico está constituido por dos elementos laterales y uno medial.

En el **paquiteno**, se completa el ensamblaje del complejo sinaptonémico el que ahora se extiende en toda la longitud de cada par cromosómico homólogo. A cada par cromosómico homólogo en sinapsis se le conoce como bivalente. Centralmente y en toda la extensión de cada bivalente queda situado el complejo sinaptonémico. En torno a sus elementos laterales se dispone la cromatina de cada cromosoma homólogo, que por estar duplicada está constituida por dos cromátides.

En el sexo heterogamético, como es el caso de los machos de mamíferos, durante el estado de paquiteno, los cromosomas sexuales X e Y se aparean estableciéndose entre ellos una sinapsis parcial a través de un corto complejo sinaptonémico. Este complejo se

forma en el sector homólogo que comparten y que se conoce como pseudoautosómico. El sector heterólogo o diferencial entre los cromosomas X e Y persiste organizado en ejes simples. Durante esta etapa la cromatina del bivalente XY permanece intensamente condensada y no transcribe, en cambio, el resto de la cromatina nuclear está descondensada y con una gran actividad en cuanto a síntesis de RNA. Es en esta etapa que los nucléolos alcanzan su máximo desarrollo.

Durante el estado de paquiteno y estando organizados los bivalentes también ocurre el "crossing over" o entrecruzamiento entre cromosomas homólogos. Este consiste en la ruptura de los DNA pertenecientes a dos cromátides homólogas y en la posterior unión intercambiada de los extremos de estos DNA, conservándose la polaridad 5' 3' de las hebras del DNA comprometido. De este intercambio resultarán nuevas combinaciones cromosómicas diferentes a las presentes en los cromosomas parentales.

En el estado de **diploteno**, se inicia el término de la profase y del apareamiento de los cromosomas. Los complejos sinaptonémicos se desensamblan, se separan los cromosomas homólogos y la cromatina de cada cromosoma comienza a condensarse. En los puntos donde ha ocurrido entrecruzamiento persisten segmentos de complejo sinaptonémico. En estos mismo sitios, al microscopio de luz, se visualizan los quiasmas.

En la **diacinesis** se rompe la envoltura nuclear, se condensa intensamente la cromatina de cada cromosoma y se terminalizan los quiasmas. Esto último significa que se resuelven los puntos de entrecruzamiento donde persistía complejo sinaptonémico. Al mismo tiempo, los cromosomas homólogos se reorientan entre sí iniciando su separación física la que culminará en la primera anafase. Durante el transcurso de la profase I, se ha producido la duplicación de los centriolos, los que en el período de diacinesis migran hacia polos opuestos de la célula. Conjuntamente con este fenómeno, se organizan los microtúbulos los que toman contacto con los cromosomas y se orientan desde un polo celular al otro.

En la **metafase I**, los cromosomas intensamente condensados se encuentran situados por pares homólogos en el ecuador de la célula y unidos por sus cinetocoros a los microtúbulos del huso meiótico. Los cinetocoros de las cromátides hermanas se orientan hacia el mismo polo celular. La orientación de los cromosomas paternos y maternos, en el

conjunto de pares cromosómicos homólogos, es al azar y de esta disposición dependerá su migración anafásica. Este fenómeno, conocido como permutación cromosómica, genera distintas posibilidades de distribuciones cromosómicas en las células resultantes. El número de distribuciones cromosómicas posibles depende del número de pares de cromosomas homólogos distintos (n) presentes en la metafase lo que puede ser representado por 2^n . Por ejemplo, si una célula en su condición diploide tiene 6 cromosomas, los que corresponden a tres pares de cromosomas homólogos, 8 serán las distribuciones posibles en las metafases I de esos meiocitos ($2^3=8$).

En la **anafase I**, se produce la separación de los cromosomas homólogos los cuales migran hacia polos celulares opuestos. La migración anafásica de los cromosomas ocurre por depolimerización de los dímeros de tubulina (que componen el extremo centriolar de los microtúbulos) y por polimerización simultánea de los microtúbulos (que se localizan entre los cromosomas miembros de un par de homólogos). De esta manera, los microtúbulos se acortan hacia el polo celular y se elongan en el ecuador celular, lo que da como resultado la aproximación de los cromosomas a los polos, los que a su vez se alejan entre sí.

Cada célula resultante después de la primera división meiótica es haploide en cuanto al número de cromosomas, sin embargo el contenido de DNA es aún $2c$ lo que se refleja en que cada cromosoma está formado por dos cromátides.

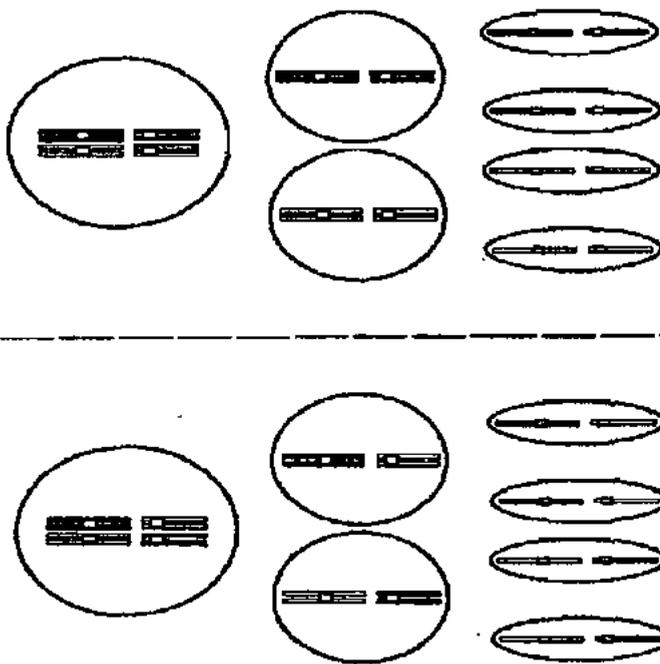
En un gran número de organismos, incluida la especie humana, después de la primera anafase meiótica se sucede inmediatamente la segunda metafase, sin mediar descondensación de la cromatina ni reorganización nuclear. Incluso, se ha demostrado que la mantención del estado condensado de la cromatina es importante para inhibir la replicación del DNA entre una y otra división meióticas.

En la **metafase II**, los cromosomas se orientan en el ecuador de la célula y los microtúbulos del huso divisional parecen unidos a los cinetocoros de los cromosomas. En esta oportunidad, los cinetocoros de las cromátides hermanas están orientados a polos celulares opuestos.

En la **anafase II**, y debido a la organización anterior, la tracción ejercida por los microtúbulos insertos en los cinetocoros ocasionará la separación de los cromátides hermanas. En este período segregan recién los cromosomas recombinados por crossing-

MEIOSIS

SEGREGACIONES CROMOSOMICAS



Basándose en la figura, responde:

¿Cuál es el número cromosómico de las células antes de la segregación y cuál es el número cromosómico de las células que ya experimentaron la segregación? Especifique.

over. También aquí ocurre la separación de los elementos constituyentes del centriolo. En la gametogénesis masculina, el centriolo volverá a ser un organelo par, despues de la duplicación de este elemento único en los inicios de la espermiogénesis.

En la **telofase II**, alrededor de los cromosomas localizados en cada polo celular, se reconstituye la envoltura nuclear. La cromatina empieza rápidamente a descondensarse y por un breve tiempo se reiniciará la actividad transcritiva. Aunque de baja magnitud la actividad sintética de este núcleo es muy significativa ya que el genoma se encuentra en estado haploide. Al mismo tiempo, ocurre la citodieresis, luego de la cual es posible hablar en propiedad de células haploides ya que lo son, tanto en el contenido cromosómico (n), como en la cantidad de DNA (c).

Soledad Berríos
Raúl Fernández Donoso

¿Cuál es la diferencia entre la figura superior y la inferior?. Explique.

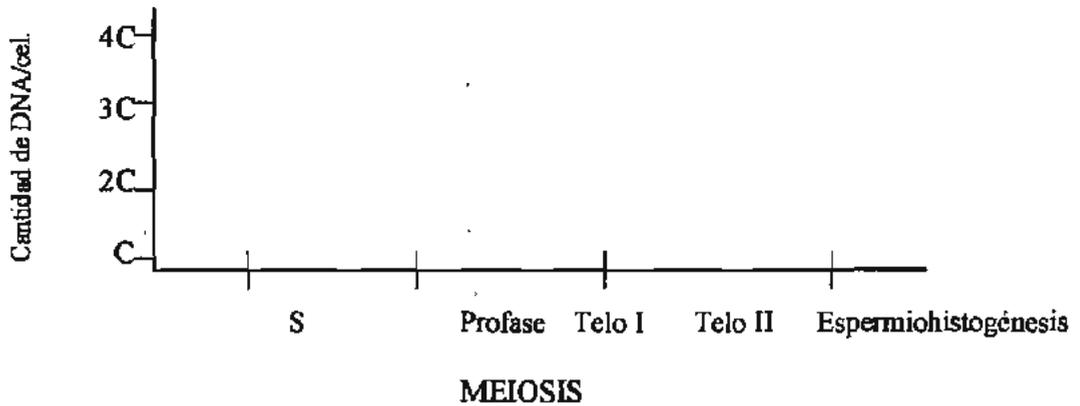
¿Qué es la permutación cromosómica? ¿Cuántas combinaciones cromosómicas es posible obtener en relación al número de cromosomas?

¿En cuál o cuáles etapas meióticas se cumplen los principios mendelianos?

Principio Mendeliano

Etapas Meióticas

CONTENIDO DE DNA (C) DURANTE LA MEIOSIS.

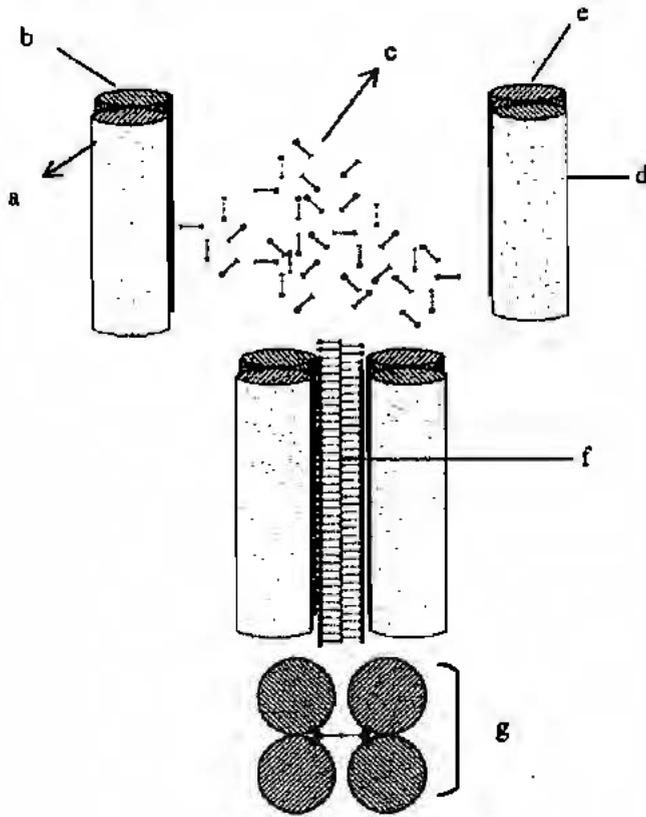


¿Cómo se define la cantidad C de DNA?

Complete el gráfico con una curva que represente las cantidades de DNA (C) presentes en una célula durante las distintas etapas meióticas.

Coloque sobre la curva de DNA, el contenido de cromosomas (n) presentes en el núcleo durante las diferentes etapas meióticas.

SINAPSIS DE CROMOSOMAS HOMOLOGOS.



En la figura se ha representado esquemáticamente la sinapsis entre dos cromosomas homólogos. Coloque los nombres de las estructuras señaladas.

- a) _____
- b) _____
- c) _____
- d) _____
- e) _____
- f) _____
- g) _____

Cuál es la relación entre:

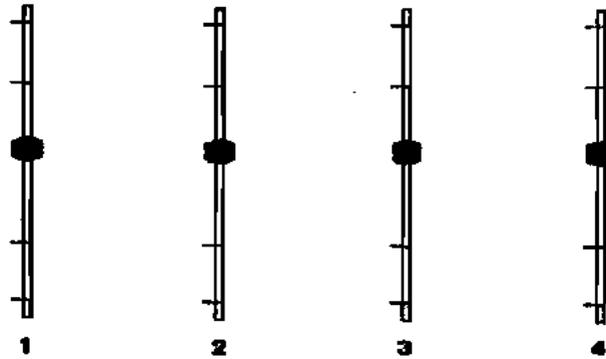
a y b

b y d

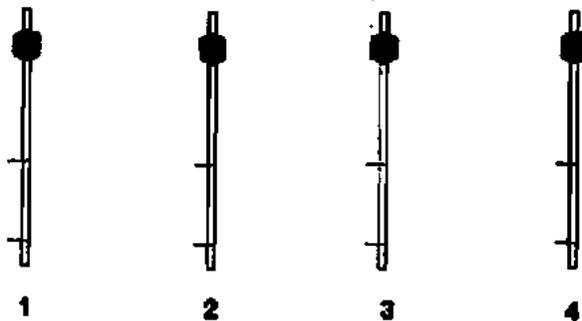
a+b y e+d

¿En que etapa de la meiosis se forma f? ¿Cuál es la función principal de esta estructura?

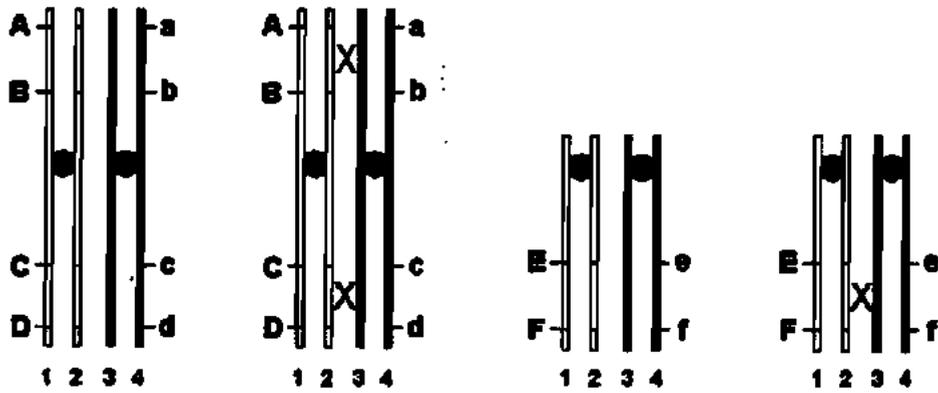
¿Cuáles habrían sido las secuencias génicas de los productos cromosómicos si en el bivalente metacéntrico hubiera habido un crossing-over entre los loci génicos C y D y entre las cromátidas 2 y 3; y un crossing over entre los loci génicos A y B y las cromátidas 1 y 4?



¿Y cuales serían los productos génicos si en el bivalente telocéntrico hubieran ocurrido dos crossing-overs ambos entre las cromátidas 2 y 3, uno entre el centrómero y el locus génico E y el otro entre los loci E y F? Distinga los centrómeros como paterno (oscuro) y materno (claro).

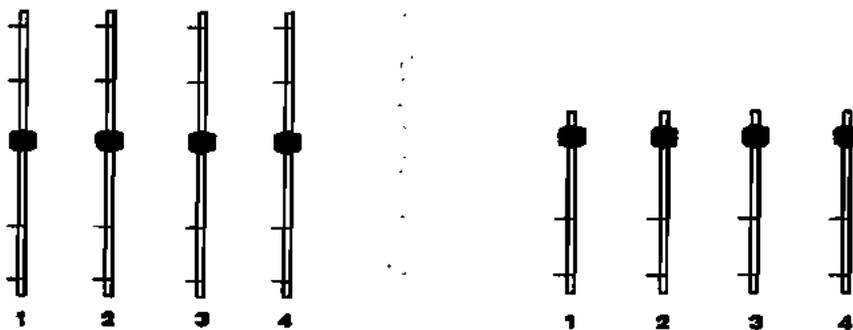


RECOMBINACION O CROSSING-OVER.

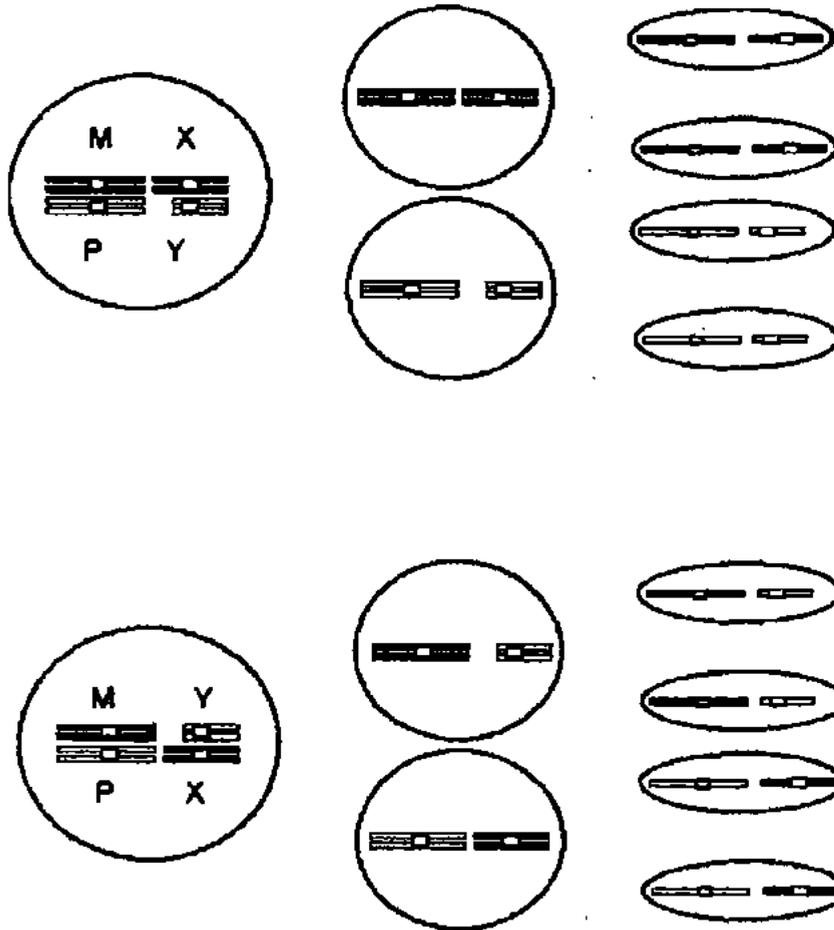


En la figura se ha representado la ocurrencia de dos crossing-over en el bivalente cromosómico metacéntrico y de uno en el bivalente telocéntrico, siempre entre las cromátidas 2 y 3.

Anote cuáles serían las combinaciones génicas en los cuatro cromosomas resultantes de cada uno de los bivalentes en recombinación.



CROMOSOMAS SEXUALES X E Y.



Esquemas que representan la 1ª y 2ª divisiones meióticas de una célula con un par cromosómico autosómico (P y M) y con un par cromosómico sexual (X e Y).

¿Cuáles son los productos meióticos resultantes de una y otra metafase, respecto de los cromosomas sexuales?. Explique.

6.3. Esta proporción de células portadoras de cromosomas X o Y ¿tendrá relación con la proporción de sexos en los individuos de la especie humana?. Fundamente.

Material Complementario

Clase

Martes 17 de Enero de 2006

“GAMETOGÉNESIS Y FECUNDACIÓN”

Profesora: SOLEDAD BERRIOS

CAPÍTULO 14

GAMETOGENESIS MASCULINA

J. Balboa F. y E. Bustos-Obregón

GENERALIDADES

La función de los testículos en el proceso reproductivo ha sido reconocida desde la antigüedad en base a observaciones realizadas en hombres y animales castrados. Los estudios de la fisiología testicular precedieron por varios siglos a las investigaciones acerca de la estructura de este órgano. Las técnicas clásicas de extirpación gonadal aplicadas al estudio de la fisiología reproductiva, comenzaron a ser usadas por Aristóteles ya en el siglo IV antes de Cristo, mientras que la primera observación de células germinales al microscopio ocurrió recién en el siglo XVII.

Junto con el mejoramiento de las técnicas microscópicas, desde la mitad del siglo XIX en adelante, hubo un gran impulso al estudio de la morfología testicular. Uno de los avances más significativos en este campo fue el descubrir que los espermatozoides se originaban de células presentes en el testículo. Esto fue seguido rápidamente por la descripción microscópica de las células intersticiales y de las células de Sertoli. La descripción morfológica y la clasificación de diferentes tipos de células germinales, así como su disposición en los túbulos seminíferos, llevó posteriormente a la definición de la secuencia de las etapas de la espermatogénesis. Esto último actualmente constituye la base para la comprensión de la cinética del proceso espermatogénico.

La mayor parte de los estudios sobre espermatogénesis se han realizado en roedores, especialmente en la rata. Sin embargo, es posible establecer una descripción general de este proceso, dada la similitud que se presenta entre las distintas especies de mamíferos.

En muchas especies de mamíferos, la espermatogénesis es un proceso continuo durante toda la vida del macho. En otras especies que presentan estacionalidad reproductiva, ocurren ciclos de actividad espermatogénica regulados por señales ambientales, entre las cuales el fotoperíodo o duración del día y la noche tiene un rol preponderante.

La espermatogénesis en el adulto se puede definir como la secuencia de eventos citológicos y bioquímicos que llevan a la formación de un espermatozoide a partir de una célula precursora o troncal. La diferenciación de la gónada,

como también las etapas embrionarias de la espermatogénesis que llevan al establecimiento de la línea germinal troncal en el adulto, son tratadas en el capítulo correspondiente.

La espermatogénesis en los mamíferos tiene lugar en el epitelio seminífero, dentro de estructuras tubulares presentes en los testículos, llamadas túbulos seminíferos. El proceso permanente de producción de espermatozoides requiere de la continua proliferación de las células germinales troncales, para proveer en forma constante nuevas células que puedan entrar en diferenciación. Además, como el núcleo del espermatozoide se fusiona con el del ovocito durante la singamia para formar un cigoto diploide, debe ocurrir necesariamente una reducción a la mitad del número de cromosomas del espermatozoide.

Se distinguen tres etapas principales que caracterizan a la espermatogénesis y que son: 1) renovación de las células troncales por mitosis, 2) reducción del número cromosómico por meiosis y 3) transformación de las células haploides en espermatozoides. Las células troncales de la espermatogénesis son las espermatogonias, las cuales después de cierto número de mitosis, entran en meiosis para originar los espermatoцитos primarios. Estas últimas células, después de una primera división meiótica, originan a los espermatoцитos secundarios, los cuales a su vez en una segunda división meiótica originan a las espermatidas. Finalmente, las espermatidas se transforman en espermatozoides mediante una secuencia compleja de cambios, en un proceso conocido como espermiogénesis (Figura 1).

Las condiciones en que ocurre la espermatogénesis son muy especializadas y requieren de la creación de microambientes particulares dentro del túbulo seminífero. En este proceso, las células somáticas del epitelio seminífero, llamadas células de Sertoli, tienen un rol esencial.

ESTRUCTURA DEL EPITELIO SEMINIFERO

El epitelio seminífero constituye la mayor parte de la pared de los túbulos seminíferos. Los túbulos seminíferos presentan una luz o lumen central, hacia donde son liberadas las espermatidas maduras al momento de la espermiación

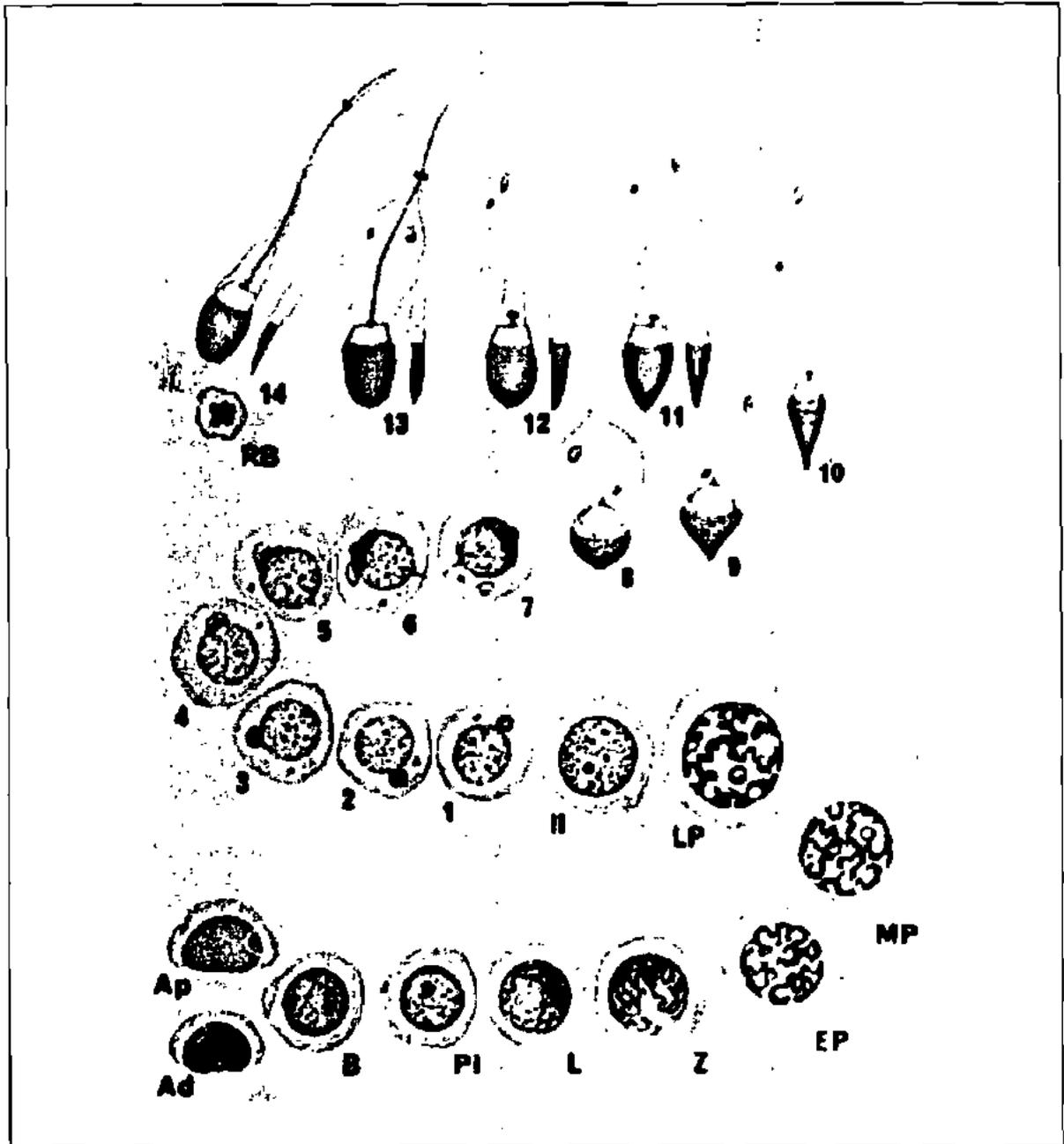


Figura 1. Secuencia de cambios de la célula germinal durante la espermatogénesis en el mono. Ap = espermatogonía A pálida; Ad = espermatogonía A oscura; B = espermatogonía B; PI = espermatocito en preleptoteno; L = espermatocito en leptoteno; Z = espermatocito en zigoteno; EP = espermatocito en paquíteno temprano; MP = espermatocito en paquíteno medio; LP = espermatocito en paquíteno tardío; II = espermatocito secundario; 1-14 = estados de diferenciación de la espermátida durante la espermiogénesis; RB = cuerpo residual.

(Figura 2). Los túbulos seminíferos son estructuras muy flexuosas, cuyos extremos se conectan a un sistema de cavidades presentes en la zona del mediastino testicular, llamada *rete testis*. Esta estructura conecta al testículo con el epidídimo, a través de los conductos eferentes. En el hombre los túbulos seminíferos no son estructuras enteramente independientes desde el punto de

vista estructural, sino que presentan varios puntos de anastomosis que los conectan entre sí. En el hombre existen aproximadamente 300 túbulos seminíferos por testículo. Cada túbulo mide alrededor de 80 centímetros de largo por unos 250 μm de diámetro.

Los túbulos seminíferos están compuestos por las siguientes estructuras, desde la periferia

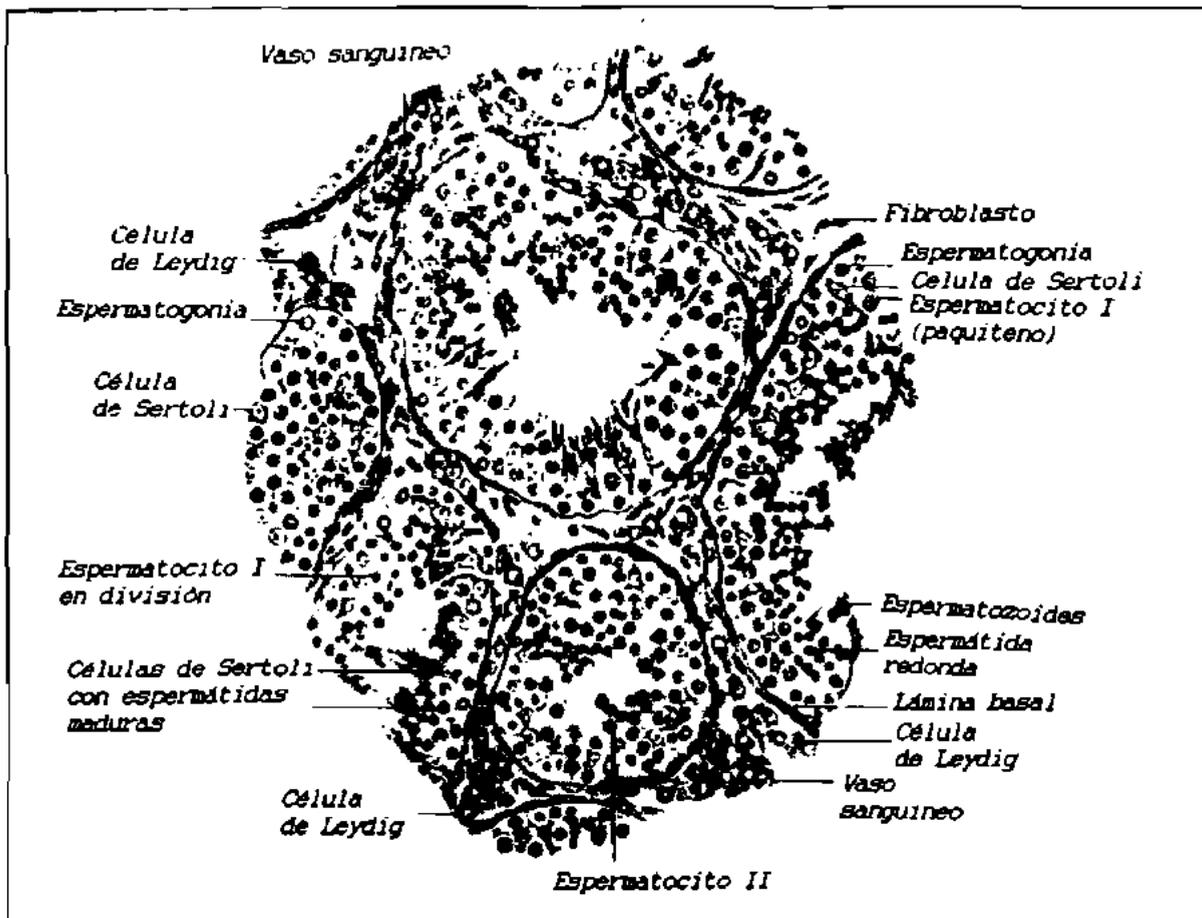


Figura 2. Sección de testículo humano. Túbulos seminíferos cortados transversalmente. Nótese que en una misma sección tubular pueden estar presentes varios estados del ciclo del epitelio seminífero (170 x).

hacia el centro: 1) el peritúbulo, compuesto por una o varias capas de células peritubulares o mioideas, según la especie; 2) una lámina basal; 3) el epitelio seminífero, y 4) un lumen o luz central (Figura 3).

El epitelio seminífero está formado por células germinales en distintos estados de diferenciación, como también por células somáticas llamadas células de Sertoli. Este último tipo celular fue descrito en 1865 por el investigador italiano Enrico Sertoli. Mediante una cuidadosa disociación en cloruro de mercurio de túbulos seminíferos obtenidos de testículos humanos, Sertoli estableció que las células somáticas del epitelio seminífero correspondían a estructuras independientes y no a un sincitio como se suponía hasta ese momento, asignándole una forma básicamente columnar con numerosas ramificaciones.

En la actualidad se sabe que la célula de Sertoli tiene un rol clave, tanto en la mantención de la estructura del epitelio seminífero, como también en la regulación del proceso espermatogénico. Numerosos estudios realizados principalmente en la rata han permitido conocer la

ultraestructura y función de la célula de Sertoli. En esa especie, la célula de Sertoli mide entre 70 y 80 μm de largo y aproximadamente 25 μm de ancho en la base, extendiéndose desde la base hasta el lumen del túbulo seminífero. Esta célula presenta numerosos procesos y recesos que forman cavidades donde se alojan las células germinales (Figura 3).

La célula de Sertoli cumple un rol fundamental en: 1) la generación y mantención de la estructura del epitelio seminífero; 2) el desplazamiento de las células germinales desde la base hacia el lumen del túbulo durante su diferenciación, y 3) la generación de microambientes en el interior del túbulo seminífero.

La célula de Sertoli constituye un ejemplo de la gran complejidad que pueden alcanzar las interacciones celulares en los procesos de diferenciación. Se ha observado que una misma célula de Sertoli, a lo largo de su eje baso-apical, mantiene una variedad de complejos de unión con diversos tipos celulares o estructuras a la vez. Estas asociaciones se pueden clasificar en: 1) Sertoli-Sertoli; 2) Sertoli-germinal, y 3) Sertoli-lámina basal.

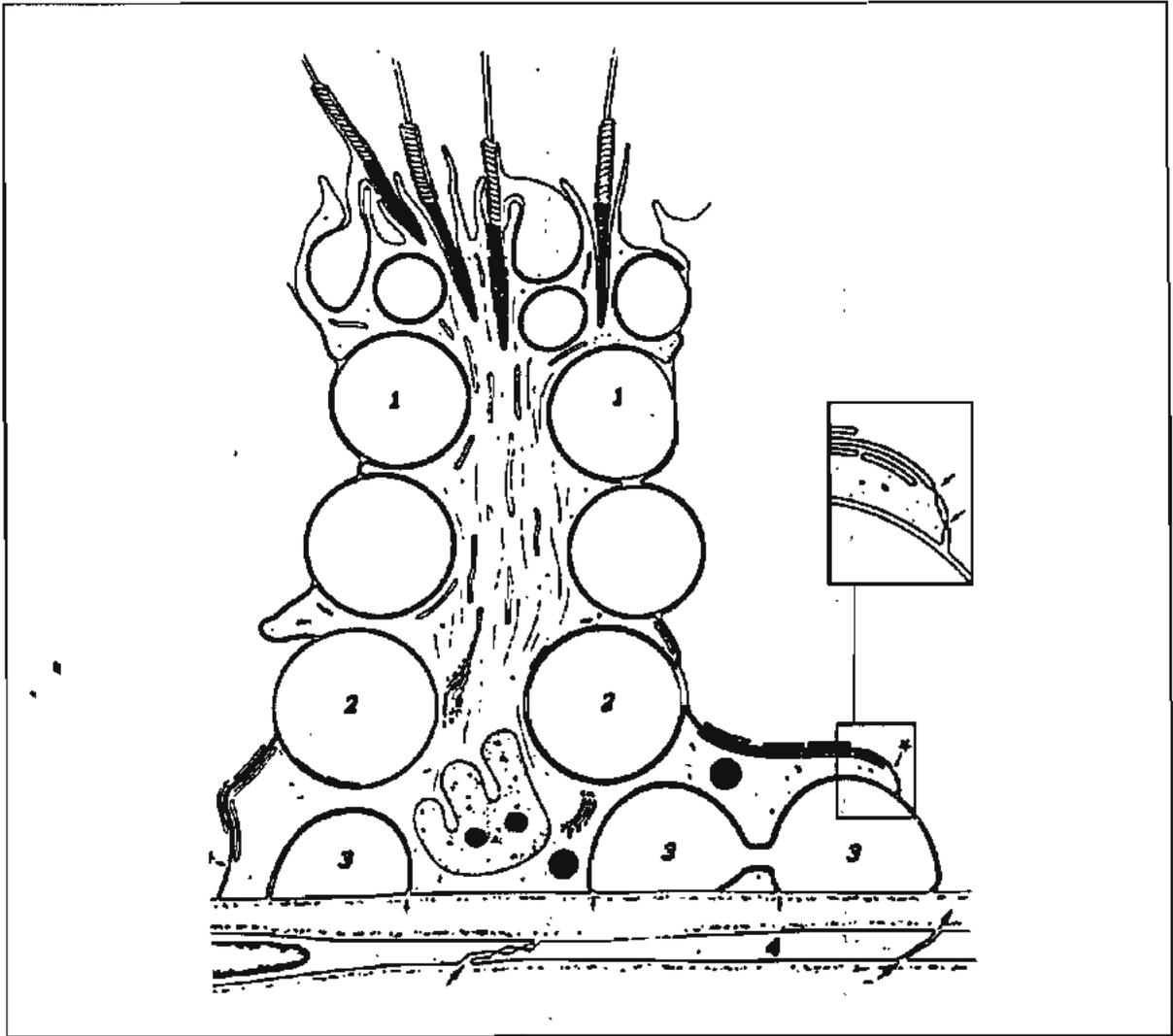


Figura 3. Estructura del túbulo seminífero. Composición del peritúbulo y del epitelio seminífero, y relaciones entre células de Sertoli y células germinales. El recuadro muestra una ampliación de las uniones oclusivas entre células de Sertoli (flechas), las que dan origen a los estratos basal (bajo las uniones oclusivas) y adluminal (sobre las uniones oclusivas) del epitelio seminífero. 1 = espermátidas; 2 = espermatocitos; 3 = espermatozoides; 4 = célula mioide.

Entre las células de Sertoli se establecen uniones del tipo oclusivo, que representan la base estructural de la barrera hematotesticular y de los microambientes intratubulares. Existe también un tipo particular de asociación entre las células de Sertoli, llamada especialización ectoplásmica, localizada por debajo de la membrana plasmática correspondiente a un ordenamiento definido de microfilamentos de actina.

Las células de Sertoli y las células germinales se relacionan mediante un tipo especial de unión mixta desmosoma-"gap", especializaciones ectoplásmicas y complejos túbulo-bulbares. La unión desmosoma-"gap" corresponde a una estructura similar a un hemidesmosoma, presente solamente en la célula de Sertoli, el que se comple-

menta con la presencia de estructuras características de la unión "gap" o nexus. Este tipo de unión relaciona a la célula de Sertoli con las espermatogonias B y espermatocitos en paquiteno, y menos frecuentemente con espermátidas redondas. Su función probablemente se relaciona con el anclaje de las células germinales a la célula de Sertoli, como también al acoplamiento metabólico entre estas células a través del intercambio de metabolitos y macromoléculas pequeñas.

Las especializaciones ectoplásmicas asociadas a células germinales están presentes sólo en la célula de Sertoli. Estas estructuras tendrían un rol importante en el anclaje de los espermatocitos en etapas posteriores al paquiteno, como

también de las espermátidas a la superficie de la célula de Sertoli.

Por último, se encuentran los complejos túbulo-bulbares, que corresponden a proyecciones del citoplasma de espermátidas maduras, asociadas a especializaciones ectoplásmicas en la célula de Sertoli. Estas estructuras, presentes en un número cercano a 20 por célula, participan en el anclaje de las espermátidas maduras a la célula de Sertoli, antes de ser liberadas al lumen del túbulo seminífero. Los complejos túbulo-bulbares también tienen un rol importante en el proceso normal de pérdida de citoplasma de las espermátidas. Se ha observado que algunas de estas estructuras son fagocitadas por la célula de Sertoli, al mismo tiempo que otras se forman, lo que tiene como consecuencia una pérdida neta de citoplasma por parte de la espermátida. La célula de Sertoli también presenta complejos de unión del tipo hemidesmosoma con la lámina basal del epitelio seminífero, lo que sería importante para el anclaje de estas células a la pared del túbulo.

En relación a la existencia de microambientes en el interior de los túbulos seminíferos, las uniones oclusivas Sertoli-Sertoli generan dos compartimientos en el epitelio seminífero, llamados compartimientos basal y adluminal (Figura 3). En el compartimiento basal se encuentran las células germinales en las etapas más tempranas de la diferenciación, desde espermatogonias hasta espermatoцитos en leptoteno. En el compartimiento adluminal, por otro lado, están presentes las células germinales desde los estados de espermatoцитos en zigoteno hasta espermátida madura.

Ambos compartimientos intratubulares presentan una composición química diferente. Esto se debe, por un lado, al acceso más o menos directo que tienen los componentes provenientes de la linfa hacia el compartimiento basal, y por otro lado, al aislamiento en que permanece el compartimiento adluminal debido a las uniones oclusivas entre las células de Sertoli. También contribuye a la generación de los microambientes intratubulares, la producción selectiva hacia estos compartimientos de algunos componentes de secreción por parte de la célula de Sertoli.

DIFERENCIACION DE LAS CELULAS GERMINALES

Aspectos morfológicos

Los espermatozoides se originan mediante un proceso complejo de diferenciación a partir de las espermatogonias A, las que constituyen la población troncal del epitelio seminífero. Estas

células residen en el compartimiento basal, sobre la lámina basal del epitelio seminífero, presentando un tamaño aproximado de 15 μm , con un núcleo pálido y ovalado que contiene una fina granulación cromatínica. Las espermatogonias A proliferan, originando algunas de ellas, a las espermatogonias B. Estas tienen un tamaño menor y poseen un núcleo esférico que presenta gránulos grandes de heterocromatina.

En varias especies de roedores, entre ellas la rata, se reconoce un tipo espermatogonial de transición, llamado espermatogonia intermedia. En el hombre se han identificado dos clases de espermatogonias A, llamadas espermatogonias A oscura y A pálida, las que se diferencian por la distinta intensidad de tinción de sus núcleos.

La meiosis en la espermatogénesis comienza con la entrada de células germinales a la etapa de espermatoцитo primario, cuya fase inicial corresponde al estado de preleptoteno. Los espermatoцитos en preleptoteno se originan de la mitosis de las espermatogonias B, lo que corresponde a la última división mitótica que se registra durante el proceso espermatogénico. Los espermatoцитos en preleptoteno son las células más pequeñas del epitelio seminífero. Presentan un tamaño de alrededor de 8 μm , citoplasma reducido y un núcleo esférico con áreas localizadas de heterocromatina densamente granular. Los espermatoцитos en preleptoteno se localizan en el compartimiento basal de los túbulos seminíferos, cercanos a la lámina basal, y desde aquí, en su paso a la etapa de leptoteno, son desplazados hacia el compartimiento adluminal. En la rata se ha descrito un compartimiento de transición, llamado compartimiento intermedio, que es ocupado temporalmente por los espermatoцитos en leptoteno.

La meiosis prosigue con el paso de leptoteno a zigoteno y posteriormente a una fase de paquiteno de larga duración, donde el espermatoцитo primario aumenta de manera importante su tamaño, alcanzando a la vez una posición más cercana al lumen en el túbulo seminífero. Las restantes etapas de la primera profase meiótica prosiguen en la forma descrita clásicamente, finalizando con la producción de espermatoцитos secundarios después de la primera división meiótica. La etapa de espermatoцитo secundario es de corta duración, y finaliza con la segunda división meiótica, originando así a las espermátidas redondas.

Posteriormente, las espermátidas redondas entran a un proceso de diferenciación de larga duración, por el cual adquieren las características morfológicas definitivas del espermatozoides, propias de cada especie. Este proceso se co-

coce con el nombre de espermiogénesis, espermiogénesis o espermatoteleosis y se caracteriza principalmente por la evolución de tres estructuras: núcleo, acrosoma y aparato flagelar. Al mismo tiempo, ocurre una serie de cambios que involucran a otros organelos citoplasmáticos. Las mitocondrias se reordenan y se distribuyen en forma helicoidal en la primera porción de la cola del espermatozoide para formar la vaina mitocondrial. Por otro lado, los microtúbulos se distribuyen en torno al núcleo de la espermátida en elongación, para formar una estructura llamada "manchette", la cual se sugiere que podría tener algún rol en el inicio del alargamiento del núcleo.

Aspectos bioquímicos

Síntesis de ácidos nucleicos. El DNA durante la espermatogénesis se replica por última vez en la etapa de preleptoteno, después de la división de las espermatogonias B. Luego de una prolongada fase de síntesis de DNA, estas células no pasan por el período G2 del ciclo celular, como ocurre en la mitosis, sino que entran directamente a la meiosis. La replicación del DNA correspondiente a los cromosomas sexuales ocurre en una etapa más tardía respecto de los cromosomas autosómicos.

Durante la meiosis la síntesis de RNA es baja, encontrándose un máximo en la etapa de paquiteno, y un cese a partir de la diacinesis. El RNA sintetizado en esta etapa es muy estable, y la mayor parte de él no es transferido inmediatamente al citoplasma. Durante la espermiogénesis la síntesis de RNA es muy escasa o nula, aunque algunas evidencias señalan que en las etapas de espermátida temprana se sintetizaría RNA mensajero correspondiente a protaminas.

Síntesis de proteínas. Las etapas de la meiosis y la espermiogénesis son muy activas en relación a la síntesis de proteínas. Esta llega a su máximo en el estado de paquiteno, y decae marcadamente en diacinesis. Durante la espermiogénesis, en los estados tempranos de espermátida, hay una activa síntesis proteica, principalmente de proteínas nucleares. Posteriormente, en los inicios de la elongación de las espermátidas, esta actividad cesa completamente, para después reanudarse intensamente en las fases finales de la elongación.

Una parte importante de las proteínas sintetizadas en la espermiogénesis corresponden a proteínas nucleares básicas específicas de la línea germinal. La función de estas proteínas es reemplazar a las histonas somáticas durante la compactación de la cromatina de la espermátida. Inicialmente tiene lugar la síntesis de un tipo de proteínas básicas, ricas en arginina y lisina,

las que se asocian temporalmente con el DNA de la espermátida. En los estados finales de la espermiogénesis, se sintetizan proteínas ricas en arginina y cisteína, del tipo protaminas, que reemplazan a las anteriores, y permanecen asociadas al DNA del espermatozoide.

Otras proteínas que se sintetizan a partir de estados meióticos o postmeióticos de la espermatogénesis corresponden a una variedad de isoenzimas específicas del testículo, como la deshidrogenasa láctica-C4 (LDH-X), la sorbitol deshidrogenasa y la fosfogliceroquinasa-2. También en estados avanzados de la espermiogénesis tiene lugar la producción de numerosas otras proteínas específicas del testículo, algunas de las cuales se encuentran presentes en la membrana plasmática de espermátidas y espermatozoides. La producción de ciertas isoenzimas y de otras proteínas exclusivas de las células germinales tiene su explicación en las condiciones metabólicas particulares en que ocurre la diferenciación de estas células, y a las funciones especiales que éstas llevan a cabo en el proceso reproductivo. Se supone que algunas proteínas de membrana, específicas de las células germinales, podrían tener un rol importante en interacciones de superficie entre estas células y las células de Sertoli, como también en la interacción espermatozoide-ovocito en el momento de la fecundación. La presencia de proteínas de superficie específicas de las células germinales tiene además gran importancia del punto de vista clínico, debido a que estas proteínas muchas veces presentan características antigénicas que potencialmente podrían inducir una respuesta inmune antiespermática, ya sea en el propio individuo o en su pareja, pudiendo verse afectada de esta manera la fertilidad.

Renovación espermatogonial

La continua producción de espermatozoides por el túbulo seminífero representa una pérdida enorme de elementos celulares. Aunque el sitio de producción (i.e., la longitud total de los túbulos seminíferos sumados) es gigantesco (por ejemplo, de unos 2 metros en el ratón, 250 metros en el hombre y cerca de 5 kilómetros en el toro), también lo es la actividad proliferativa espermatogonial en el adulto, que caracteriza al epitelio germinal como un tejido en renovación.

Las espermatogonias proliferan periódicamente, por ejemplo, en los estados del ciclo IX, XII-XIV y I para los tipos A en la rata, dando origen a un mayor número de espermatogonias más diferenciadas, como son In y B. Este proceso constituye la amplificación espermatogonial. Al mismo tiempo, las espermatogonias proveen de células indiferenciadas de tipo A, capaces de

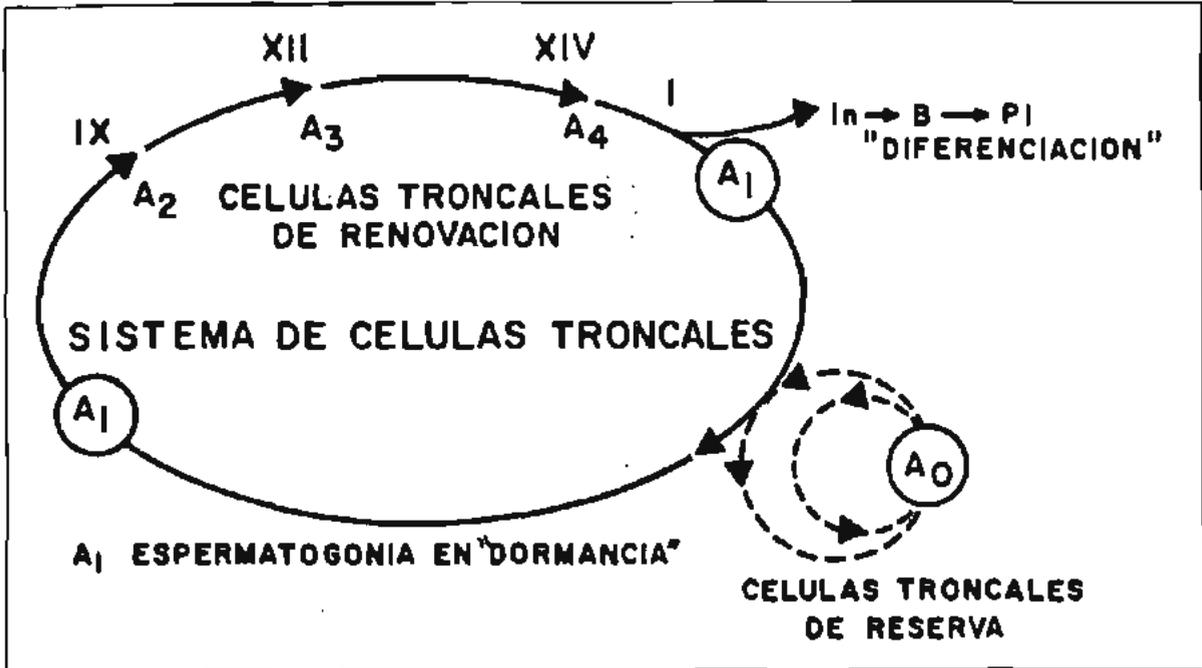


Figura 4. Sistema de renovación de las espermatogonias troncales en la rata. El sistema A1-A4 corresponde al conjunto de espermatogonias en renovación, en tanto que A0 corresponde a un sistema de reserva, que entra en ciclo celular al depletarse experimentalmente la población de espermatogonias A. Se señalan los estados del ciclo en que hay mitosis de gonias A (IX-XII-XIV y I) y los elementos germinales "comprometidos" (gonias In y B, y espermatoцитos preleptoténicos, P1), que se indican como "diferenciados", pues no revierten en ninguna condición a la calidad de célula troncal.

repetir el mismo proceso en el ciclo siguiente (células troncales o "stem cells") (Figura 4).

El estudio de la renovación espermatogonial requiere de una adecuada identificación de los tipos goniales, de un análisis cuantitativo que permita establecer filiación entre ellos, de un análisis dinámico en el tiempo (usualmente por radioautografía), y de la caracterización topográfica de las espermatogonias a lo largo de la lámina basal del túbulo. Esto se obtiene por mapeo en cortes seriados, o mejor aún, por el análisis de túbulos seminíferos montados *in toto*. Este último método ha permitido distinguir cinco tipos de espermatogonias A (A0 y A1 - A4) en la rata. Según este modelo, las gonias A1 - A4 constituyen un sistema troncal en renovación, en tanto que las gonias A0 se consideran como gonias troncales de reserva, que pueden entrar en activa proliferación cuando el epitelio germinal depletado (por ejemplo, por radiación) está en fase de recuperación.

La renovación espermatogonial en el hombre es aún objeto de controversia. Inicialmente se propuso que las espermatogonias A oscuras podrían corresponder a las células troncales del epitelio seminífero. Estudios más recientes, sin embargo, han comprobado que en diversos trastornos de la espermatogénesis, como son la criptorquidia, la depleción de células germinales por

efectos de la radiación y algunos desbalances hormonales, las únicas espermatogonias que permanecen poblando los túbulos seminíferos son las espermatogonias A pálidas. Estas observaciones concuerdan mejor con un modelo de renovación espermatogonial en que las espermatogonias A oscuras se originan de las espermatogonias A pálidas, constituyendo éstas la población troncal del epitelio seminífero en el hombre.

Una concepción alternativa sobre renovación y proliferación espermatogonial en roedores se debe a Huckins, que distingue gonias tipo A aisladas e indiferenciadas, las que actuarían como células troncales (Am), presentando la mayor parte de ellas un ciclo celular corto. Al dividirse, generarían nuevas Am (A "stem"), o células goniales que van a diferenciarse. Unas pocas Am tienen ciclo largo (de hasta trece días en la rata), y cuando reasumen el ciclo proliferativo entran a diferenciación. Estas Am de ciclo largo serían las gonias radiorresistentes, y las que perpetúan la espermatogénesis durante la vida reproductiva del animal.

Cinética de la espermatogénesis

Junto a las células de Sertoli, se desarrollan varias generaciones de células germinales en el túbulo seminífero. Una "generación" se define

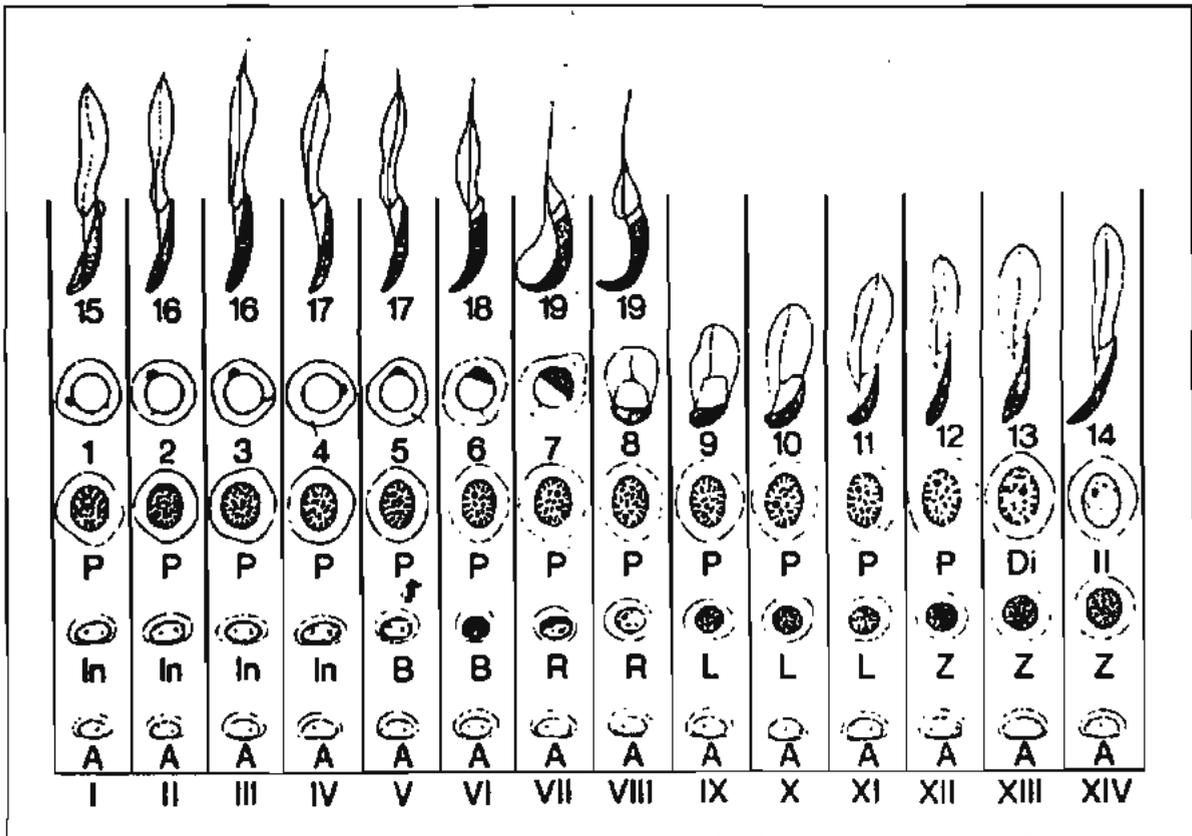


Figura 5. Ciclo del epitelio seminífero en la rata. Composición de las catorce asociaciones celulares del epitelio seminífero en la rata. Cada columna vertical (identificada por número romano de I a XIV) corresponde a un estado del ciclo. La secuencia de los 14 estados constituye un ciclo del epitelio seminífero. Nomenclatura: A, In, B = tipos de espermatogonia; R, L, Z, P, Di = espermatocitos primarios en preleptoteno, leptoteno, zigoteno, paquíteno y diacinesis, respectivamente; II = espermatocitos secundarios; 1-19 = etapas de la espermiogénesis.

como un grupo de células en aproximadamente el mismo estado de desarrollo. Las varias generaciones celulares evolucionan sincrónicamente y no están agrupadas al azar, sino en asociaciones celulares de composición más o menos fija, que constituyen los estados del ciclo (Figura 5). Estas son subdivisiones artificiales, cuyo número varía según la especie, el criterio utilizado y el investigador. Tan sólo para la rata se han propuesto diez o más clasificaciones por diversos autores.

De acuerdo al sistema de identificación de la evolución del acrosoma de las espermátidas teñido específicamente por el método del ácido peryódico-Schiff (PAS), como un marcador del estado del ciclo propuesto por Leblond y Clermont, hay catorce estados en la rata y seis en el hombre. Cada estado ocupa un segmento tubular a lo largo del túbulo seminífero, el cual con el tiempo evoluciona al estado siguiente y así sucesivamente. La serie completa de estados posibles, con las irregularidades (modulaciones) que pueden presentarse, constituye el ciclo del epitelio germinal. Cada uno de los seis estados del

ciclo en el hombre ocupa sólo un pequeño segmento de la pared tubular, por lo que la aparición de tres o más estados en secciones transversales de los túbulos es frecuente. Ello ha motivado dificultades en la definición y conocimiento exactos de la cinética de la espermatogénesis en este material.

Onda del epitelio germinal. Así como el ciclo representa la evolución cronológica de los diferentes estados, la onda del epitelio germinal representa la evolución topográfica a lo largo del túbulo. Sin embargo, no hay una correspondencia absoluta entre el criterio dinámico (ciclo) y el estático (onda), ya que mientras la duración de la primera es prácticamente invariable, el largo de la segunda oscila en un rango amplio (por ejemplo, entre 0.7 a 6 cm, en la rata).

Duración del ciclo. El ciclo representa la evolución cronológica de las diferentes generaciones de células germinales. Debido a la arquitectura del epitelio germinal, el proceso de espermatogénesis comprende varios ciclos, e interesa conocer la duración de éstos y de aquella como

consecuencia. Los métodos usados son varios: radioautográfico, repoblación del epitelio post-administración de citostáticos o acción del calor, depleción madurativa postirradiación, etc.

De ellos, el más exacto y fisiológico es la radioautografía a intervalos seriados, luego de una sola inyección de un precursor marcado del DNA, usualmente timidina tritiada.

A un tiempo corto (por ejemplo, una hora) después de la administración del isótopo *in vivo*, se marcarán todas aquellas células que en ese momento se encontraban en período S (síntesis de DNA). Estas son las espermatogonias (en ciertos estados del ciclo) y los espermatocitos en preleptoteno.

Si el tejido se observa a intervalos más largos, las células marcadas que se detectan (designadas como células marcadas más avanzadas) derivarán su radiactividad de aquellas células inicialmente marcadas (ya que *in vivo* más del 95% de la timidina ha desaparecido de la circulación a los cincuenta minutos de administrada por vía parenteral). Las células marcadas más avanzadas delimitan un frente de marcación, cuya pro-

gresión con el tiempo puede seguirse con un método gráfico y nos indica la velocidad de evolución de los diversos tipos de células germinales, y por ende la duración del ciclo y de la espermatogénesis en la especie analizada (Figura 6). Esta es una constante biológica que no se modifica ni siquiera en condiciones experimentales drásticas (por ejemplo, en la espermatogénesis residual posthipofisectomía o en la recuperación de la espermatogénesis luego de la depleción postirradiación).

Heller y Clermont estudiaron por radioautografía biopsias testiculares seriadas en el tiempo, luego de la inyección intraescrotal de timidina tritiada. Así se encontró que la duración del ciclo del epitelio germinal es de 16 ± 1 día en el hombre, una de las más largas en mamíferos. Puede calcularse que la duración de la espermatogénesis en el hombre es aproximadamente de 4.6 ciclos (o sea 74 ± 4 días). Agregando el tiempo de transporte epididimario (estimado en 8 a 17 días), resulta el tiempo necesario para que aparezcan en el eyaculado espermatozoides derivados de la división original de una gonia troncal.

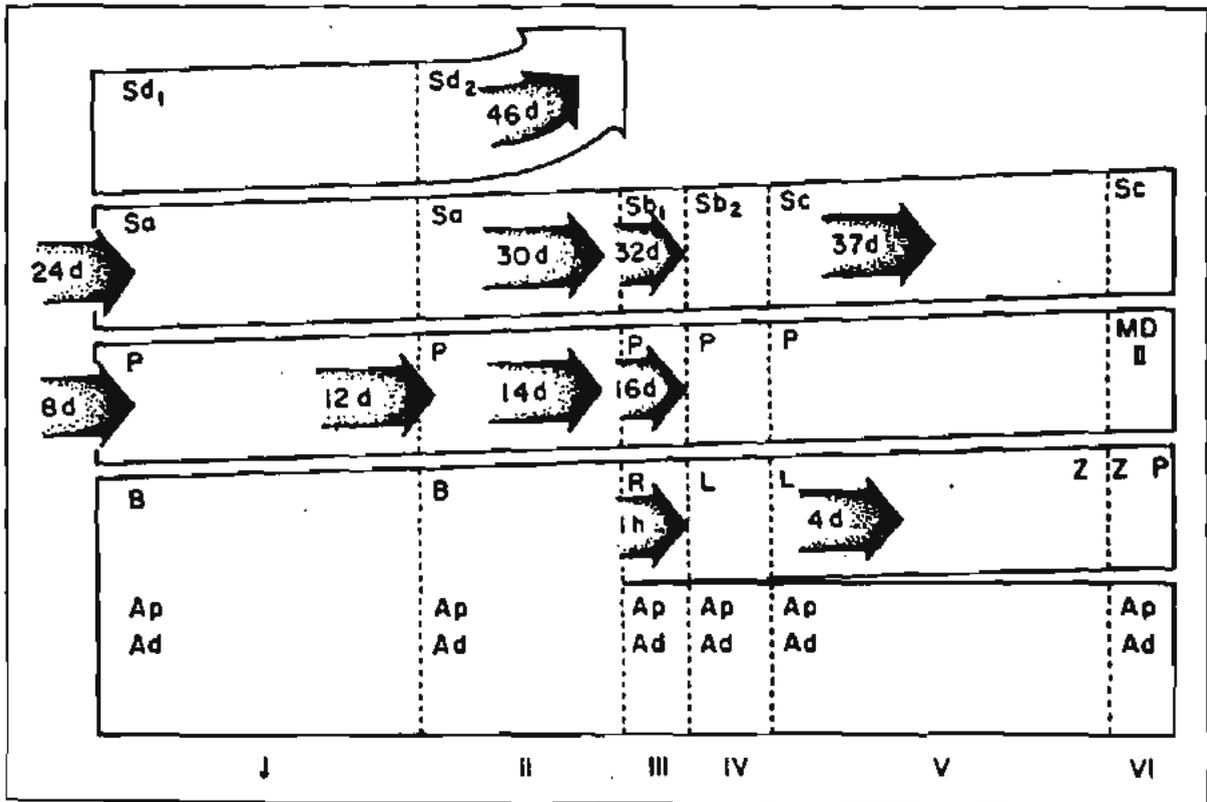


Figura 6. Duración del ciclo del epitelio seminífero en el humano. El diagrama ilustra la duración del ciclo y la composición celular de los seis estados del ciclo del epitelio seminífero humano, numerados del I al VI. El espacio que cada estado ocupa en la abscisa es proporcional a su duración relativa. Nomenclatura: Ad, Ap, B = espermatogonia A oscura, A pálida y B pálida; R, L, Z, P = espermatocitos primarios en preleptoteno, leptoteno, zigoteno y paquiteno, respectivamente; II = espermatocito secundario; Sa-Sd₂ = espermátidas. Las flechas indican las células marcadas más avanzadas a los intervalos que se señalan, después de una sola inyección intratesticular de timidina-H₃.

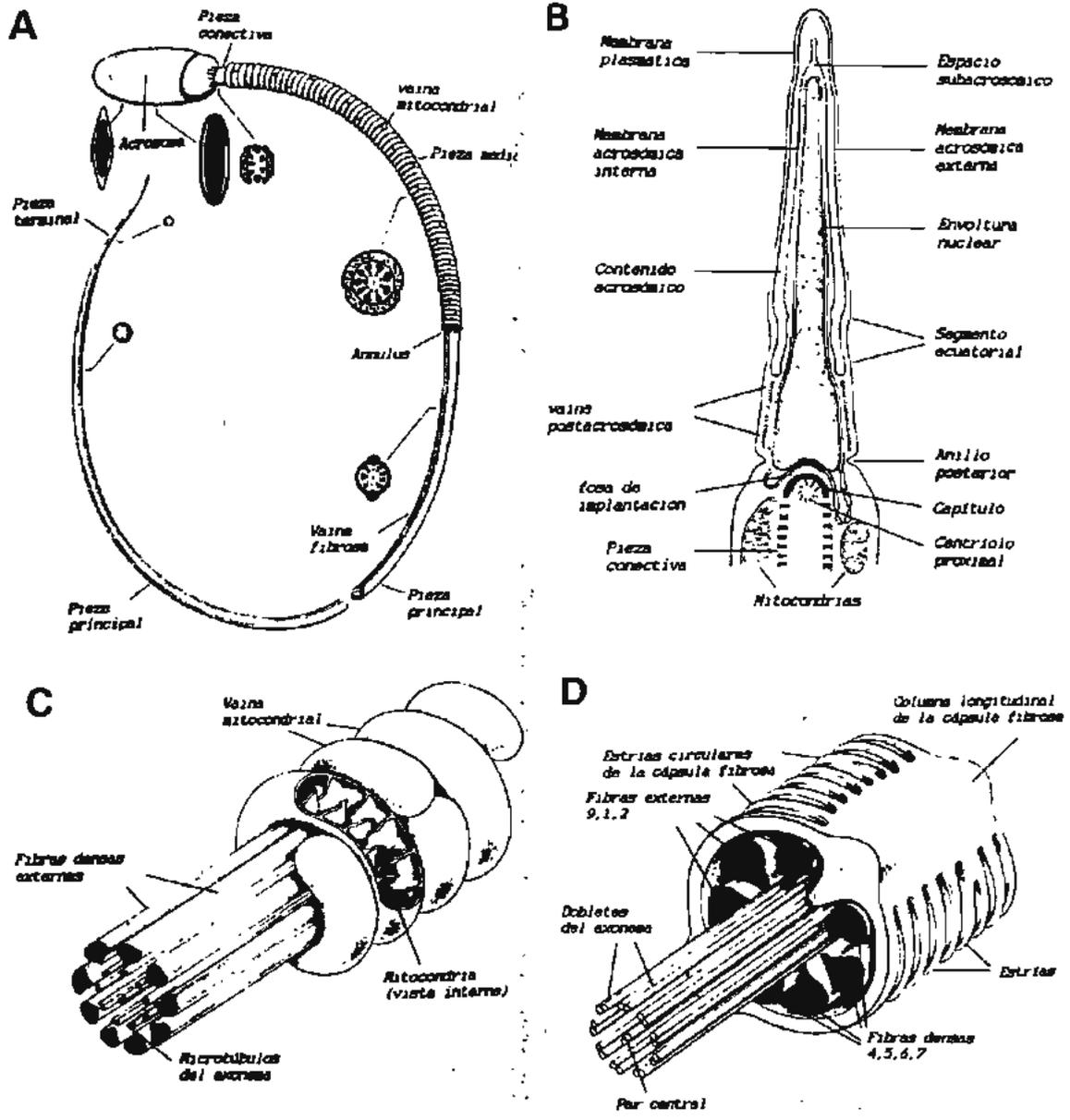


Figura 7. Estructura del espermatozoide humano. A. Vista general mostrando la estructura interna de los diferentes segmentos del espermatozoide. Para facilitar la comprensión del esquema, en éste no se ha incluido la membrana plasmática; B. Cabeza y cuello; C. Pieza media; D. Pieza principal.

ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE

En los espermatozoides de mamíferos se distinguen dos partes principales, la cabeza y la cola o flagelo, siendo esta última la porción más larga. La cabeza contiene el acrosoma, el núcleo y una pequeña porción de citoplasma (Figura 7-A).

El acrosoma corresponde a una vesícula de secreción de gran tamaño, que se origina en el aparato de Golgi y envuelve estrechamente la región anterior del núcleo. Esta estructura contiene hialuronidasa y acrosina, las que participan probablemente en la penetración del espermatozoide a través de las cubiertas del ovocito

durante la fecundación. En el acrosoma se han descrito numerosas otras enzimas hidrolíticas, cuya función es menos conocida. Estas incluyen proteasas del tipo de la colagenasa y de la catepsina D, además de neuraminidasa, arilamidasa, esterases no específicas, aspartilamidasa, arilsulfatasa, fosfatasa ácida, acetilglucosaminidasa, beta-glucuronidasa y fosfolipasa A.

En el acrosoma se distinguen dos regiones, correspondientes al acrosoma anterior y al segmento ecuatorial. El segmento ecuatorial se mantiene después de la reacción del acrosoma, y se hace continuo con la membrana plasmática,

correspondiendo éste al punto por donde se fusionan las membranas plasmáticas del espermatozoide y del ovocito durante la fecundación (Figura 7-B).

El núcleo del espermatozoide es haploide y contiene sólo un miembro de cada par de cromosomas de la especie, encontrándose la cromatina altamente compactada. Esta condición se genera durante la espermiogénesis, donde ocurre un recambio de las histonas por proteínas ricas en arginina y cisteína, del tipo protaminas. Entre estas proteínas se establecen uniones disulfuro que conducen al aumento en la compactación de la cromatina. La cromatina del espermatozoide experimenta un grado aún mayor de compactación durante su tránsito por el epidídimo, como parte del proceso de maduración espermática que ocurre en este órgano.

En la cola se distinguen cuatro segmentos, que son: 1) la pieza conectiva o cuello; 2) la pieza media; 3) la pieza principal y 4) la pieza terminal. Las cuatro estructuras principales que contiene la cola son: 1) el axonema; 2) la vaina mitocondrial; 3) las fibras densas externas y 4) la cápsula fibrosa.

El axonema corresponde a un conjunto de microtúbulos con una conformación de nueve pares periféricos y un par central, extendiéndose a lo largo de toda la cola. El centriolo distal da origen al axonema, mientras que el centriolo proximal queda integrado en la pieza conectiva del espermatozoide.

La pieza media contiene la vaina mitocondrial, que corresponde a un conjunto de mitocondrias localizadas justo por debajo de la membrana plasmática, y ordenadas en posición helicoidal rodeando al axonema. Entre la pieza media y la pieza principal se encuentra una estructura fibrosa, llamada "annulus" (Figura 7-C).

La pieza principal es el segmento más extenso de la cola y contiene la cápsula fibrosa en una posición adyacente a la membrana plasmática, mientras que la pieza terminal no contiene ninguna otra estructura especial fuera del axonema (Figura 7-D).

Otras estructuras importantes corresponden a las fibras densas externas, las que en un número de nueve recorren gran parte de la cola, comenzando en la pieza conectiva y terminando en la pieza principal.

La membrana plasmática del espermatozoide exhibe una gran complejidad, distinguiéndose claramente ciertas regiones que difieren en composición y función. Esto ha llevado a considerarla como un mosaico de dominios restringidos, lo que es un reflejo de funciones especializadas que llevan a cabo los componentes de superficie y citoplasmáticos del espermatozoide en el pro-

ceso reproductivo. La existencia de este alto grado de regionalización no significa, sin embargo, que la membrana del espermatozoide sea una estructura rígida. Por el contrario, la organización de la membrana del espermatozoide en dominios es dinámica, registrándose variados cambios en composición y estructura durante la vida del espermatozoide.

Los principales dominios de la superficie de la cabeza del espermatozoide son: 1) región anterior del acrosoma y segmento ecuatorial, ambas por encima del acrosoma, y 2) región post-acrosómica, que corresponde a la porción de la cabeza posterior al acrosoma. Más atrás en la porción del cuello, se encuentra una región llamada anillo posterior o anillo nuclear, la que constituye una firme unión entre la cabeza y la cola del espermatozoide. La superficie de la cola se divide en dos regiones, correspondientes a la pieza media y a la porción posterior de la cola.

En la mayoría de las especies de mamíferos, la membrana plasmática de la región anterior del acrosoma y del segmento ecuatorial contiene partículas intramembranas dispuestas al azar, mientras que en la región post-acrosómica se observan agrupaciones. La membrana plasmática de la porción posterior de la cola posee partículas intramembranas de mayor tamaño que las encontradas en la pieza media, distribuidas en largas cadenas. Estas partículas poseen una depresión central semejante a un poro, lo que ha llevado a postular que podrían constituir complejos proteicos involucrados en el transporte de iones. También se ha sugerido que estas partículas podrían ser estructuras de fijación de algunos componentes del axonema, por lo que estarían involucradas en el movimiento del flagelo.

REGULACION DE LA ESPERMATOGENESIS

Actualmente se sabe que la espermatogénesis en los mamíferos está controlada, a diferentes niveles, por un sistema complejo de variados factores. Estos incluyen a las hormonas y a las interacciones locales entre las células testiculares (Figura 8). Las hormonas, que integran el nivel endocrino de este sistema regulatorio, tienen un rol esencial en la mantención de la espermatogénesis. Las interacciones celulares locales y la autorregulación de la función de las células testiculares, que integran los niveles de control paracrino y autocrino respectivamente, también tienen un rol importante, constituyendo éstos un nivel fino de control de la espermatogénesis.

Las hormonas involucradas principalmente en la regulación de la espermatogénesis, son las gonadotropinas y la testosterona. Esto fue demostrado experimentalmente por Smith en la primera mitad del presente siglo; comprobó que

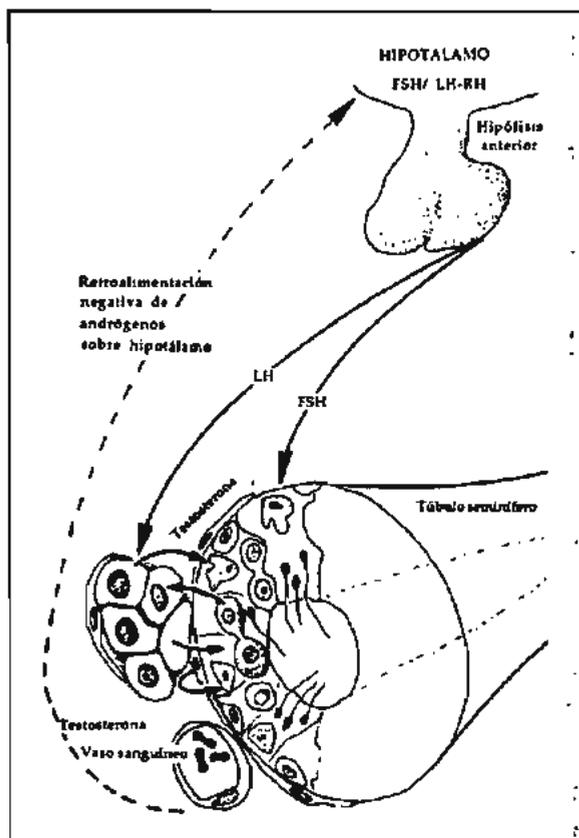


Figura 8. Regulación de la espermatogénesis. Eje hipotálamo-hipófisis-gónada, con las principales vías de regulación endocrina de la espermatogénesis. Los números del 1 al 4 señalan las principales interacciones celulares probablemente involucradas en el control paracrino. El sentido de las flechas indica la dirección de la acción reguladora: 1. Leydig-Sertoli; 2. Sertoli-Leydig; 3. Peritubular-Sertoli; 4. Germinal-Sertoli.

la hipofisectomía en la rata causaba una rápida involución de la función testicular, incluida la detención de la espermatogénesis.

Los efectos reproductivos derivados de la hipofisectomía pueden revertirse cualitativamente mediante la administración de LH o de altas dosis de testosterona, lo que parece señalar que la espermatogénesis depende solamente de estas hormonas. Estudios más recientes, sin embargo, han demostrado que la FSH también es necesaria para la mantención cuantitativa de la actividad espermatogénica, esto es, para la producción de un número normal de espermatozoides.

En relación al rol preciso que estas hormonas tienen en el proceso espermatogénico, es poco lo que se sabe. Estudios recientes señalan que la testosterona, en combinación con la FSH, sería importante en la conversión de las espermatogonias a espermatozoides, como también en la

conversión de espermatozoides a espermátidas. Por otro lado, el paso de espermátidas redondas a espermátidas en elongación sería regulado principalmente por la testosterona.

La acción hormonal sobre la espermatogénesis no se ejerce directamente sobre las células germinales, sino que a través de las células somáticas del testículo. Estas convierten los estímulos hormonales a señales químicas, las que modifican los microambientes en los que se diferencian las células germinales. Actualmente se conoce un gran número de componentes producidos por la célula de Sertoli, y que están bajo control hormonal. El rol preciso de muchos de estos factores no se conoce con certeza, pero se supone que pueden tener un rol importante en los procesos regulatorios locales o paracrinos en el testículo.

La FSH estimula en la célula de Sertoli la secreción de proteínas, tales como ABP ("Androgen Binding Protein"), transferrina, y ceruloplasmina, las que participan en el transporte de andrógenos y iones metálicos. Otro factor proteico producido por la célula de Sertoli, y que podría ser importante en la regulación de la función testicular, corresponde a la inhibina, la cual además de inhibir la liberación de FSH a nivel hipofisiario parece también tener un rol regulador local en el testículo. La LH, por otro lado, ejerce su acción sobre la espermatogénesis principalmente a través de la estimulación de la producción de testosterona en las células de Leydig. En relación a la testosterona, hasta hace poco tiempo se suponía que la espermatogénesis requería de la existencia de una alta concentración de este esteroide en el testículo. Sin embargo, recientemente se ha comprobado que la espermatogénesis puede ocurrir aún a concentraciones de testosterona correspondientes a un 20% del valor normal, bajo lo cual recién se produce una inhibición del proceso espermatogénico.

Se han descrito diversas otras interacciones paracrinas *in vitro* entre las células testiculares, que podrían también tener un rol importante en la regulación de la actividad espermatogénica. Además de la testosterona, las células de Leydig producen péptidos derivados de la proopiomelanocortina, que también influyen en la función de la célula de Sertoli. Por otro lado, las células de Sertoli pueden estimular la producción de testosterona en las células de Leydig, mediante la secreción de péptidos similares al factor de liberación hipotalámico LH-RH. Las células peritubulares, por su parte, secretan factores denominados P-MODS bajo el estímulo de la testosterona, los cuales aumentan la producción de ABP en la célula de Sertoli. Las células de Sertoli, de Leydig y las células peritubulares integran a

la vez un sistema complejo de interacciones paracrinas junto a las células germinales y a la matriz extracelular, estando todo este sistema influido por la LH, FSH y testosterona.

ALTERACIONES DE LA FERTILIDAD EN EL HOMBRE

La falla de la función espermatogénica en forma irreversible conduce a esterilidad. Si aquélla es parcial o recuperable, ocasiona grados variables de infertilidad; ésta se define como la incapacidad de procrear del varón en condiciones de factor femenino normal y luego de un año de relaciones sexuales sin uso de métodos anticonceptivos.

Al menos un 15% de todos los matrimonios experimentan problemas de fertilidad conyugal. Aproximadamente un 35% es de causa exclusivamente femenina, y un número semejante sólo debido al varón, en tanto que se reconocen factores de ambos cónyuges en un 25%. En menos de un 5% de los casos no se encuentra explicación en ninguno de los consortes. En un 95% de los casos en que se identifican las causas de la infertilidad, ésta puede tratarse en forma médica o quirúrgica según corresponda, con un éxito del orden del 50%.

Las causas de infertilidad del varón se clasifican en:

1. *Pretesticulares*: desórdenes endocrinos extragonadales que llevan a alteraciones de la espermatogénesis (8%).

2. *Testiculares*: la falla primaria radica en el testículo (80%), como por ejemplo, hipoespermatogénesis, detención de la maduración espermatogénica, ausencia de células germinales (síndrome de Sertoli solo), síndrome de Klinefelter (XXY) y sus variantes; otros síndromes genéticos

(YYY), criptorquidia, daño por radiación, quimioterapia, tóxicos, infección viral (por ejemplo orquitis urliana), etc.

3. *Postesticulares*: con espermatogénesis normal, pero con obstrucción total o parcial de algún segmento de la vía seminal, de causa congénita (malformaciones) o adquirida (postinfección, tumores, etc.); voluntaria (vasectomía con fines anticonceptivos) o accidental (iatrogénica, como por ejemplo sección del deferente en reparación de hernia).

En este grupo se incluyen las fallas funcionales del espermatozoide (generalmente defectos de motilidad) que pueden deberse a: a) maduración o almacenamiento inadecuado en el epidídimo; b) anormalidad bioquímica del plasma seminal (producto de secreción de las glándulas sexuales accesorias, principalmente vesículas seminales y próstata) y c) defectos genéticos del espermatozoide (por ejemplo, anomalía del flagelo con pérdida de la motilidad debida a la ausencia de los brazos de dineína, o síndrome del cilio inmóvil o de Kartagener).

BIBLIOGRAFIA

1. De Kretser DM, Kerr JB: The cytology of the testis. En: Knobil E, Neill JD. (eds): The Physiology of Reproduction, vol 1. New York: Raven Press 1988; pp 837-932
2. Setchell BP: Spermatogenesis and spermatozoa. En: Austin CR, Short RV. (eds): Reproduction in Mammals. vol.1. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press 1982; pp 63-101
3. Skinner M: Cell-cell interactions in the testis. *Endocr Rev* 1991; 12: 45-77
4. Steinberger E, Steinberger A. Spermatogenic function of the testis. En: Greep RO, Astwood EB. (eds): Handbook of Physiology, Secc. 7: Endocrinology. vol. V. Male Reproductive System. Baltimore: 1975; pp 1-19

CAPÍTULO 15

GAMETOGENESIS FEMENINA

M. Vega B.

ASPECTOS GENERALES

La formación del gameto femenino (ovogénesis) es un proceso que ocurre en el ovario. En la mayoría de las hembras de mamíferos comienza tempranamente en el período embrionario, quedando determinado en esta etapa, el número definitivo de células germinales de la hembra. En la pubertad, al hacerse el ovario sensible a las gonadotropinas hipofisarias, se establece un proceso cíclico de producción de gametos, dividiéndose el ciclo ovárico en dos etapas: fase folicular y fase lútea.

El ovario posee una función citogénica (liberación periódica de ovocitos) y una función endocrina (síntesis de hormonas esteroidales). Morfológicamente, está organizado en una zona central que es la médula, rodeada de una zona periférica llamada corteza (Figura 1). En la corteza ovárica se encuentran los folículos que contienen los ovocitos. El desarrollo normal del gameto femenino es estrictamente dependiente del desarrollo normal del folículo (foliculogénesis) al cual pertenece.

FOLICULOGENESIS

Los folículos pueden existir en distintos estados de desarrollo. A medida que el folículo cambia morfológicamente, existen cambios bioquímicos que reflejan el proceso de diferenciación celular. La base principal de esta citodiferenciación es el desarrollo de receptores, que le permiten a las células foliculares responder a distintos estímulos, promoviendo en ellas la síntesis de hormonas esteroidales, andrógenos y estrógenos (17 beta estradiol, E₂).

En un ovario postpuberal (hembra en edad reproductiva), los folículos pueden estar al estado de folículos primarios, secundarios, terciarios, de De Graaf y atrésicos. Los folículos primordiales representan la población de folículos que no están en desarrollo, de los cuales se van a reclutar los folículos que crecerán en cada ciclo ovárico. En este sentido, los folículos primordiales constituyen las unidades fundamentales de la reproducción. En cada ciclo ovárico de la vida fértil de la hembra, un número de folículos primordiales (3-30) abandonan la población de fo-

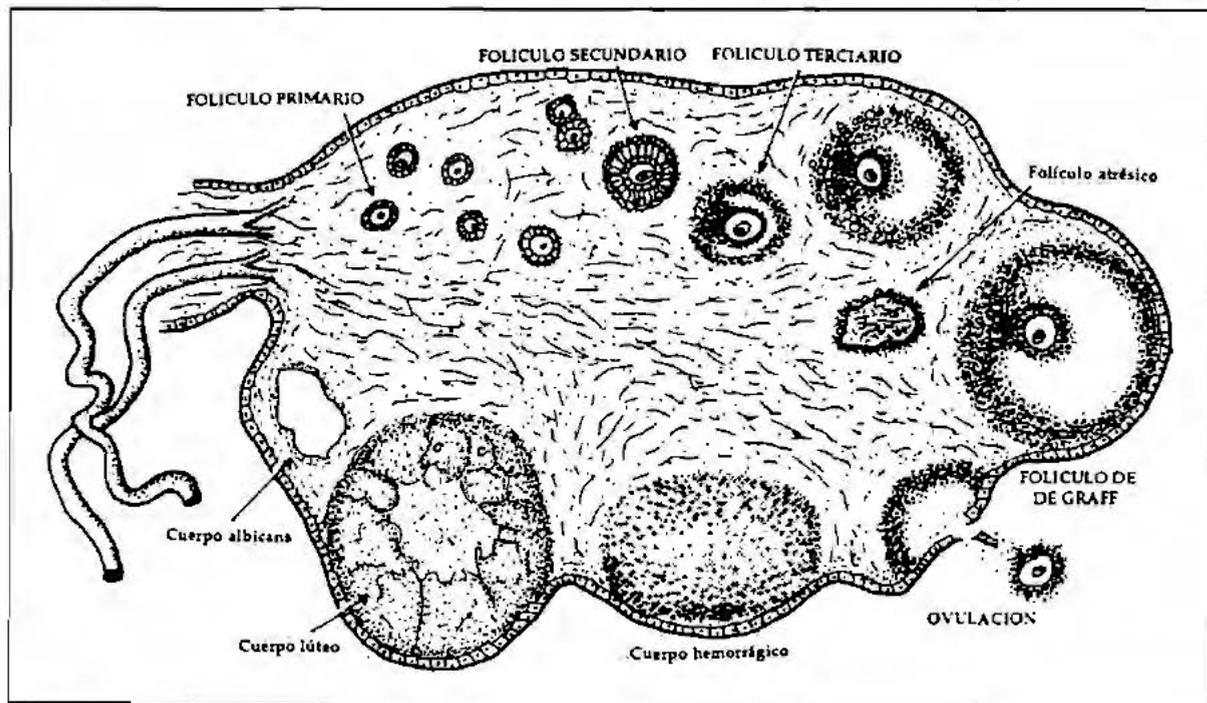


Figura 1. Diagrama de un ovario de mamífero, en el cual se han esquematizado los estados progresivos del crecimiento y desarrollo folicular.

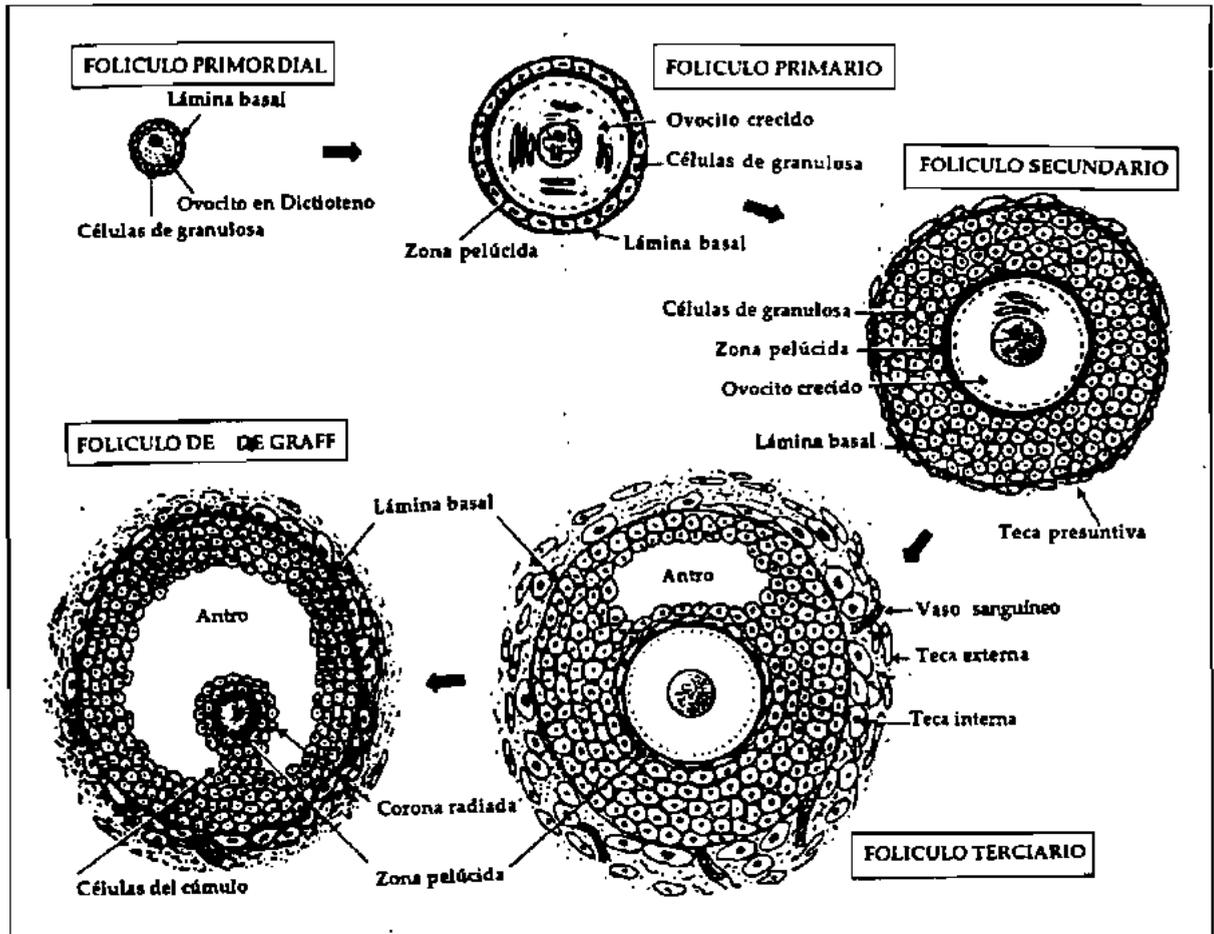


Figura 2. Clasificación de los folículos ováricos durante su crecimiento y desarrollo.

liculos de reserva (reclutamiento) y comienzan a crecer.

Folículos primordiales: estructura y función

Los folículos primordiales están compuestos de una capa de células epiteliales planas, llamadas células de granulosa (CG), que rodean a un ovocito inmaduro al estado de dictioteno. Esta estructura está rodeada a su vez, de una matriz delgada llamada lámina basal (Figura 2). Por lo tanto, las CG como el ovocito están en un microambiente en el cual no existe el contacto con otras células.

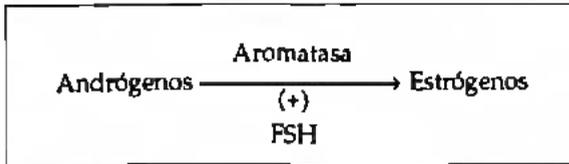
El crecimiento y desarrollo folicular comienza con el reclutamiento, proceso por el cual un folículo primordial es estimulado a dejar la población de folículos de reserva e iniciar el desarrollo. Este proceso empieza en el embrión y termina en la menopausia, cuando se depleta la población de folículos primordiales. Los ovarios están provistos con el mensaje capaz de iniciar el reclutamiento; por lo tanto, este proceso no dependería de la acción de hormonas extragonadales como las gonadotropinas hipofisarias

(hormona luteinizante, LH; hormona folículo estimulante, FSH).

Folículos primarios: estructura y función

La primera transformación observada de folículo primordial a folículo primario, es el cambio en la forma de las CG, de células planas a cúbicas. En esta etapa, el ovocito aumenta de tamaño y se forma la zona pelúcida (ZP), material glicoproteico de origen ovocitario que rodea totalmente al ovocito (Figura 2).

En el estado primario tardío, el ovocito crecido está rodeado completamente de una ZP delgada, de una sola capa de CG cúbicas y de la lámina basal. Además en este estado tardío, la citodiferenciación se manifiesta por el inicio de la expresión de receptores para FSH en las membranas de las CG. La FSH estimula la mitosis, lo que trae consigo un aumento en el número de CG; este efecto mitogénico de FSH es fundamental para el crecimiento folicular. Aún más, FSH estimula la formación del E₂ folicular a partir de andrógenos, mediante la activación del complejo enzimático aromatasa:



El efecto mitogénico de FSH se debería en parte, a este mecanismo.

Folículos secundarios: estructura y función

En la etapa del crecimiento de *folículos secundarios*, las CG proliferan y el ovocito completa su crecimiento (alrededor de 120 μm en la mujer y 80 μm en el ratón). Al final del estado secundario, el folículo es una estructura simétrica, rodeada de la lámina basal, con 4-5 capas de CG, y el ovocito en posición central cubierto de una ZP gruesa (Figura 2). La ausencia de células de la teca del folículo (las cuales sintetizan andrógenos) hasta esta etapa del desarrollo folicular, dan cuenta de la baja síntesis de E_2 en estos folículos y, por ende, del moderado índice proliferativo observado en ellos.

A fines de esta etapa, ocurre una migración de células mesenquimáticas del estroma ovárico hacia la lámina basal del folículo. Al alcanzar la lámina basal, estas células se alinean paralelamente, formando un arreglo radial alrededor de toda la estructura. Estas células darán origen a las células de la teca interna (TI) y teca externa (TE) (Figura 2). Otro evento importante en el folículo secundario es el desarrollo de un aporte sanguíneo adecuado. Los capilares sanguíneos irrigan la TI y TE, terminando en la lámina basal, por lo que el ovocito y las CG no poseen una vascularización directa.

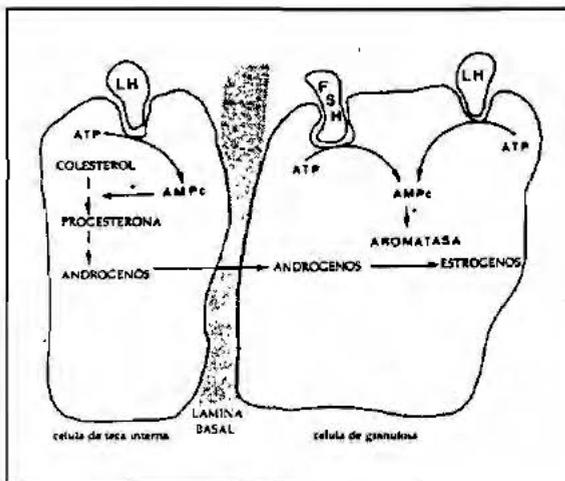


Figura 3. Síntesis de estradiol por las células de la granulosa. El sustrato (andrógenos) es aportado por las células de la teca interna. LH = hormona luteinizante. FSH = hormona folículo estimulante. ATP = Adenosin trifosfato. AMPc = Adenosin monofosfato cíclico.

Hasta este momento, el desarrollo folicular es independiente del efecto de las gonadotrofinas hipofisiarias, LH y FSH.

Folículos terciarios: estructura y función

La característica principal del *folículo terciario* es la aparición del antro. Este comienza con la acumulación de fluido folicular entre las CG, lo que resulta en la formación de una pequeña cavidad interna en un polo del folículo. Debido a esto, el folículo adquiere una polaridad y organización interna compleja, que permanece a lo largo de la foliculogénesis (Figura 2). El fluido folicular está formado por productos de secreción de las CG, y transudado de los capilares sanguíneos que irrigan las células de la teca.

Se observa además, que entre las CG se desarrollan uniones comunicantes (uniones "gap"), las cuales también existen entre las CG de la corona radiada y el ovocito. Consecuentemente, las CG y el ovocito están eléctrica y metabólicamente acoplados cuando el folículo alcanza el estado terciario temprano. En este momento, también se forman uniones "gap" entre células de la TI. Por lo tanto, la ocurrencia de uniones comunicantes en el folículo terciario le permite a éste una sincronización funcional en respuesta a la estimulación hormonal.

Simultáneamente, las células de la TI se activan y se transforman en células con una gran capacidad de sintetizar andrógenos, en respuesta a la estimulación con LH. Esto es posible debido a la expresión de receptores para LH en las células de la TI.

Folículos preovulatorios o De Graaf: estructura y función

Como resultado del efecto de las gonadotrofinas que llegan al folículo en desarrollo por los capilares, el folículo terciario aumenta enormemente de tamaño y se transforma en *folículo preovulatorio o De Graaf* (en la mujer, 25 mm) (Figura 2). Este crecimiento es debido a la acumulación de fluido folicular en el antro, y principalmente a la proliferación de las CG. Este gran aumento en el índice mitótico de las CG en este momento se explica, en parte, por la gran capacidad de síntesis de E_2 que adquiere el folículo, ya que la mayor parte de los andrógenos sintetizados por las células de la TI atraviesan la lámina basal, ingresando a las CG donde son convertidos a estrógenos por la acción del complejo aromatasa (Figura 3). Contrario a los folículos pre-antrales (folículos primarios y secundarios), este crecimiento está completamente bajo el control de LH y FSH.

A las capas de CG que rodean al ovocito se las denomina células del cúmulo, y a las CG más

cercanas al ovocito, corona radiada, constituyendo en su conjunto una estructura denominada *cúmulo oóforo*. Durante el desarrollo del folículo de De Graaf, las CG se vuelven diferentes unas de otras, en relación a la polaridad y posición relativa dentro del folículo (Figura 4). La corona radiada se conecta con el ovocito y la ZP; el cúmulo hace contacto con la corona radiada y las CG; las CG hacen contacto con la lámina basal. Las CG que ya han desarrollado receptores para FSH y E_2 en esta etapa desarrollan además, receptores para LH. Por otra parte, la TI mantiene su morfología, y prolifera hasta obtener 5-8 capas de estas células en el folículo preovulatorio.

Los folículos primordiales que son reclutados (3-30) pueden: a) crecer, desarrollarse y transformarse en folículos preovulatorios, proceso conocido como *selección folicular*, o bien, b) pueden degenerar por un proceso llamado *atresia*.

a. *Selección folicular*. La selección del folículo dominante requiere de la acción de LH y FSH sobre las células de la TI y CG, respectivamente. El folículo seleccionado no es necesariamente el más grande, sino aquel que presenta el índice mitótico más alto en las CG. Como ha sido mencionado en respuesta a LH, las células de la TI sintetizan andrógenos a partir de colesterol, los cuales atraviesan la lámina basal e ingresan a las CG donde son transformados en E_2 por la aromatasa, activada por FSH (Figura 4). El E_2 producido proporciona un microambiente permisivo esencial para la normalidad del desarrollo folicular, y la mantención de la producción de estrógenos es la base de la selección folicular. En este sentido, se ha planteado que los folículos seleccionados que serán dominantes, tienen la capacidad de concentrar FSH en su fluido folicular; esta gonadotropina es el principal estímulo para la inducción de la actividad del complejo aromatásico. En consecuencia, en el folículo seleccionado la síntesis de E_2 a partir de andrógenos tecales aumenta, provocando un aumento en la proliferación de las CG y un aumento en el tamaño del folículo.

b. *Atresia folicular*. De los $1-2 \times 10^6$ folículos estimados presentes en la hembra al nacer, aproximadamente sólo 400 están destinados a transformarse en folículos dominantes; por lo tanto, el 99,9% de los folículos se pierden por atresia, constituyendo éste el proceso de ocurrencia mayoritaria en el ovario. La atresia es una muerte selectiva de CG y del ovocito; al contrario, las células de la TI experimentan hipertrofia.

Los mecanismos involucrados en el proceso de atresia dependerán del estado de desarrollo

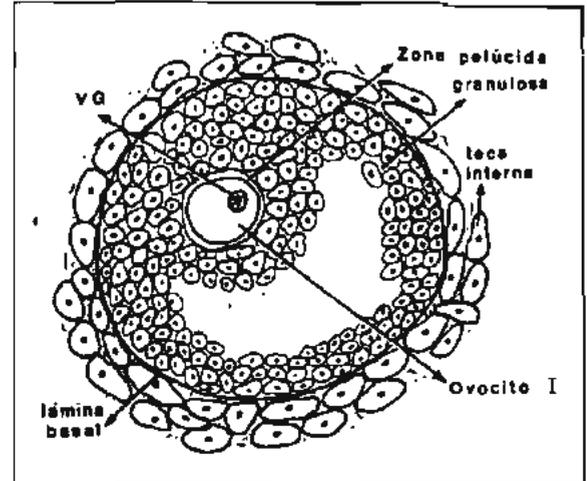


Figura 4. Relaciones que adquieren las células constituyentes del folículo durante el desarrollo folicular.

del folículo. Por ejemplo, en folículos preantrales (primarios y secundarios), el andrógeno reduce la sensibilidad de las CG a la acción de estrógenos. En el caso de folículos antrales, existe un cambio en la función de las células de la TI, que se transforman de una célula productora de andrógenos en una productora de progesterona, disminuyendo por lo tanto, el sustrato de la aromatasa y, por ende, la producción de estrógenos por las CG. En ambos tipos de mecanismos, la LH y principalmente los andrógenos aparecen como los responsables del proceso atrésico, siendo capaces de controlar la proliferación y la muerte celular.

OVOGENESIS

Poco después del nacimiento, el ovario humano posee entre $1-2 \times 10^6$ folículos primordiales, con ovocitos detenidos en dictioteno de la primera profase meiótica, y disminuyendo a 400.000 al inicio de la pubertad. La población de folículos de reserva es permanente, con un número fijo y determinado tempranamente en el desarrollo embrionario.

El gameto femenino debe experimentar una serie de cambios morfológicos y funcionales para transformarse en un ovocito fecundable. Así, en cada ciclo ovárico de la hembra post puberal, el ovocito debe: a) crecer y luego, b) reiniciar la meiosis.

a. *Fase de crecimiento*. La fase de crecimiento del ovocito está asociada con la acumulación y almacenamiento de materiales nutritivos y de información, algunos de los cuales son críticos para el desarrollo del embrión preimplantacional. Así, la síntesis de RNA y su acumulación son actividades importantes en los ovocitos de

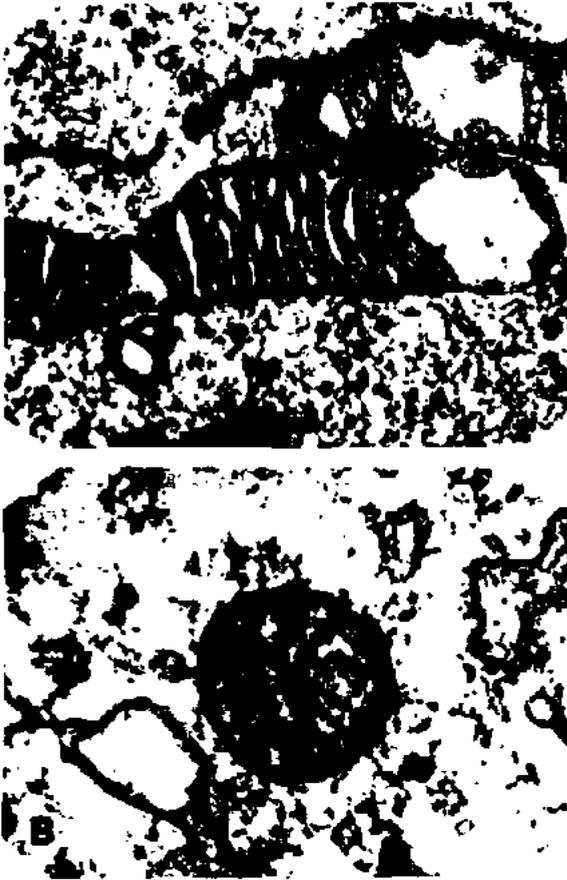


Figura 5. Microfotografías electrónicas de transmisión comparando la ultraestructura mitocondrial durante la fase de crecimiento del ovocito de ratón. Se observa un cambio marcado desde mitocondrias elongadas (A) a mitocondrias redondas con crestas concéntricas (B).



Figura 6. Microfotografías electrónicas de transmisión comparando la ultraestructura del complejo de Golgi durante la fase de crecimiento del ovocito de ratón. Se observan cambios marcados desde lamelas aplanadas (A) a lamelas granulares, altamente vacuoladas (B).

mamíferos en crecimiento. Un ovocito que ha completado su crecimiento posee alrededor de 200 veces más RNA, y 1.000 veces más ribosomas que una célula somática de mamífero. Es especialmente importante la gran cantidad de RNA mensajero que poseen los ovocitos, lo que se refleja en la acumulación de proteínas en estas células (poseen 50-60 veces más proteínas que los hepatocitos). Durante esta etapa de crecimiento, el ovocito humano incrementa su tamaño de 20 μm a 120 μm .

Inicialmente, el diámetro del ovocito y el del folículo están relacionados lineal y positivamente hasta el folículo terciario temprano, después del cual el ovocito deja de crecer, mientras que el crecimiento folicular continúa. O sea, el ovocito completa su crecimiento muy temprano en el desarrollo folicular, cuando el diámetro del folículo es de 400 μm . El enorme crecimiento de la célula indica una actividad metabólica intensa, la cual a su vez, se refleja en cambios ultraestructurales del ovocito, incluyendo la aparición de

nuevas estructuras, como los gránulos corticales y la ZP, ambos implicados en el proceso de fecundación. Tanto el núcleo (vesícula germinativa) como el nucleólo de los ovocitos en crecimiento aumentan su tamaño. Esto indica un período de gran actividad de síntesis de RNA ribosomal; las mitocondrias cambian su forma alargada con crestas transversales a una forma oval con crestas concéntricas (Figura 5).

Asimismo, el complejo de Golgi experimenta grandes cambios ultraestructurales durante el crecimiento del ovocito, reflejando una gran actividad de este organelo. Así, en ovocitos pequeños, las membranas del Golgi aparecen como sacos aplanados asociados a pocos gránulos o vacuolas. Durante la fase de crecimiento, se observa la asociación de numerosas vacuolas, gránulos, vesículas recubiertas y vesículas lipídicas, con las membranas del Golgi (Figura 6). Estos cambios son consistentes con una participación del Golgi en el procesamiento y concentración de productos de secreción (glicoproteínas de la

ZP) y formación de gránulos corticales durante el crecimiento del ovocito.

Los gránulos corticales son pequeños organelos esféricos, rodeados de membranas, semejantes a los lisosomas. Se ubican cercanos a la membrana plasmática del ovocito (región cortical), y se fusionan con ella durante la fecundación, liberando su contenido (proteinasas) al espacio perivitelino y alterando las propiedades funcionales de la ZP (bloqueo a la poliespermia). La ZP es una capa acelular que rodea completamente al ovocito. Es de origen ovocitario y se forma durante la fase de crecimiento. Está formada por diversas glicoproteínas, que forman largos filamentos que se entrecruzan y separan al ovocito de las células foliculares. Sin embargo, existe contacto entre el ovocito y las células de la corona radiada a través de las extensiones de las membranas de las CG que atraviesan la zona pelúcida y establecen una comunicación a través de uniones "gap" con la membrana del ovocito (Figura 7).

b. *Reactivación de la meiosis.* Al completar el ovocito su crecimiento, éste reinicia la meiosis y se transforma así en una célula apta para ser fecundada. La maduración meiótica es la conversión de ovocitos I ya crecidos (presentes en folículos antrales) en ovocitos II, inmediatamente antes de la ovulación y después del alza de LH. Es decir, la maduración meiótica involucra la primera división reduccional, así como cambios metabólicos necesarios para la activación del gameto femenino durante la fecundación. La adquisición de la capacidad para reiniciar la meiosis (competencia meiótica) se obtiene al término de la fase de crecimiento del ovocito.

La descarga masiva de LH ocurre horas antes de la ovulación (24-36 horas en la mujer, 12 horas en la rata) y produce una serie de cambios morfológicos y bioquímicos a nivel de la pared del ovario del folículo, en las células foliculares así como en el ovocito.

Como consecuencia del alza de LH, se reactiva la meiosis 3 ó 4 horas antes de la ovulación.

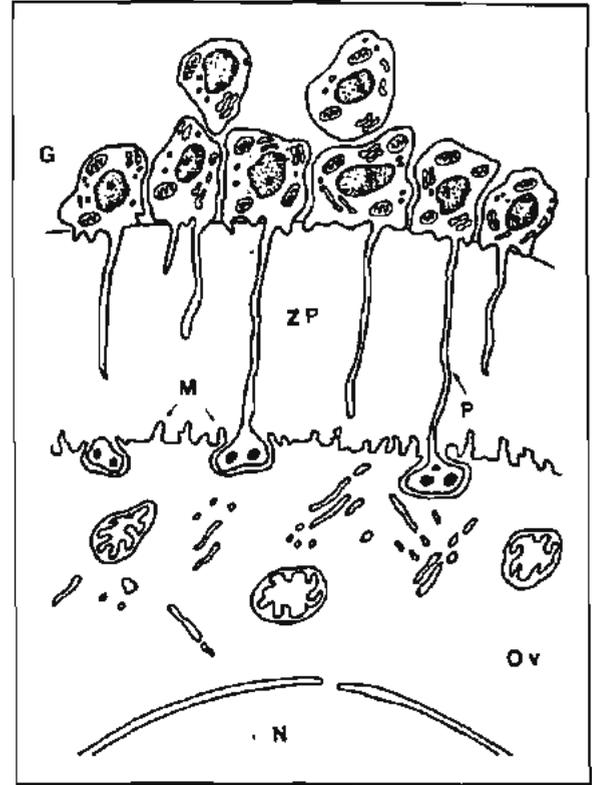


Figura 7. Diagrama de la ultraestructura del complejo corona-ovocito, destacándose las interrelaciones entre las células de la corona y el ovocito. G = células de granulosa (corona radiada). ZP = zona pelúcida. P = prolongaciones de las células de la corona radiada. OV = ovocito I. N = núcleo. M = microvellosidades.

Lo primero que ocurre es la ruptura de la vesícula germinativa, recondensación de los cromosomas y la progresión del proceso meiótico hasta metafase I y luego a metafase II sin la ocurrencia de profase II. Al parecer, este evento estaría estimulado por un factor proteico de origen ovocitario, llamado factor promotor de la maduración (MPF).

La progresión del ovocito a metafase II comprende la primera división meiótica (ovocito II) y la expulsión del primer corpúsculo polar (polocito I);

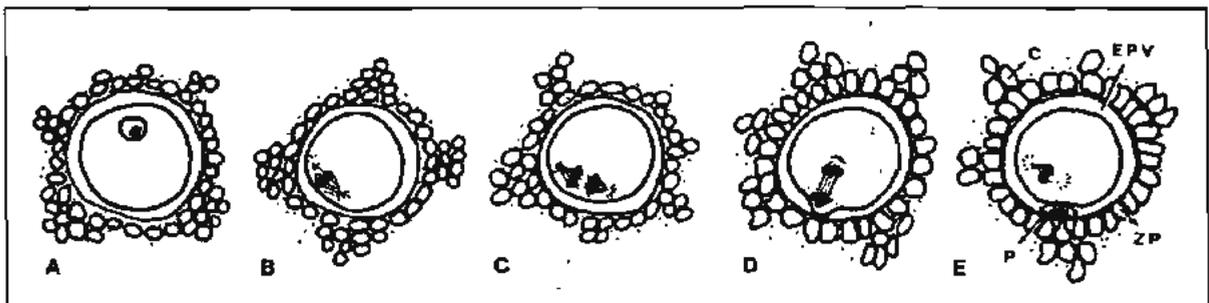


Figura 8. Maduración preovulatoria del ovocito I. A. Estado de vesícula germinal. B. Metafase I. C. Anafase I y rotación del huso. D. Expulsión del polocito I. E. Ovocito II en metafase II. EPV = espacio perivitelino. C = células del cúmulo (granulosas). P = polocito I. ZP = zona pelúcida.

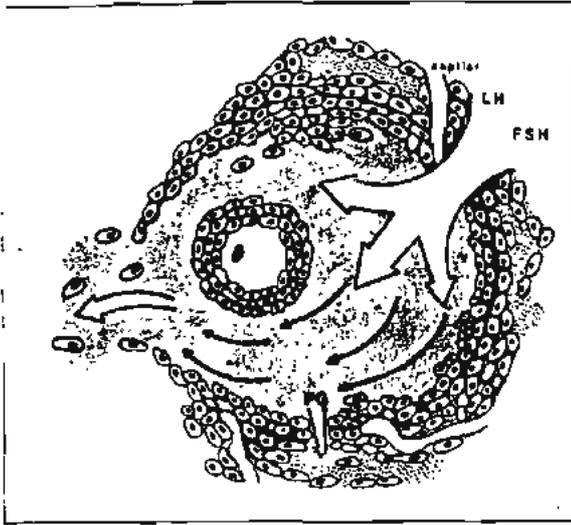


Figura 9. Diagrama del proceso de ovulación. Por efecto de las gonadotropinas, las células foliculares secretan enzimas y prostaglandinas (PG) que ayudan a la ruptura folicular.

ambas células son haploides y contienen la mitad del complemento cromosómico original. Después del alza de LH, el huso mitótico se desplaza a la periferia de la célula, situándose paralelo a la membrana plasmática del ovocito, quedando los cromosomas en forma perpendicular (Figura 8). Ocurre la separación de los cromosomas homólogos, junto con la división asimétrica del citoplasma del ovocito. El primer corpúsculo polar contiene además, una variedad de organelos, incluyendo mitocondrias, ribosomas y gránulos corticales. Los cromosomas en esta estructura empiezan a degenerar en la telofase I tardía.

La segunda división meiótica es breve y se detiene al estado de metafase II (segundo reposo meiótico). El ovocito es ovulado en este estado y la segunda división meiótica se completará sólo si el ovocito II es penetrado por un espermatozoide. En ese momento, se produce la expulsión del segundo corpúsculo polar al espacio perivitelino, y el ovocito se transforma en un cigoto o huevo fecundado.

Además del factor promotor de la maduración, se ha descrito una serie de otros factores que regulan la maduración meiótica de los ovocitos. Entre éstos, el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) inhibe la ruptura de la vesícula germinativa; en cambio, niveles altos de Ca^{++} intracelular podrían ser importantes inductores de la ruptura de ésta. La comunicación intercelular (uniones "gap" entre las células de la corona radiada y el ovocito) también cumple un rol en la mantención del primer reposo meiótico. A través de este tipo de uniones, pasan al ovocito pequeñas moléculas como AMPc e inhibidores de la maduración del ovocito.

OVULACION

Otra de las consecuencias del alza de LH en la hembra es la ruptura folicular u ovulación. Este proceso marca la culminación de una serie de eventos iniciados por el alza de LH, y caracterizado por la reiniciación de la meiosis, ruptura de la vesícula germinativa, y liberación de una célula germinal madura desde el ovario, capaz de ser fecundada.

Después de la descarga masiva de LH, la lámina basal del folículo de De Graaf se interrumpe, y vasos sanguíneos así como células de la TI empiezan a introducirse en la capa de células de granulosa. Se produce, además, cambios en las células del cúmulo y de la corona radiada, las cuales pierden las uniones "gap", y se mantienen unidas en forma laxa por una sustancia rica en glicosaminoglicanos, producida por las CG. Esto hace que el cúmulo se expanda, dejando al ovocito libre en la cavidad folicular, y facilitando la captación del complejo cúmulo-corona-ovocito por la fimbria del oviducto. En ese momento, existe síntesis de prostaglandinas, histamina y de enzimas (colagenasa, plasmina) en las células foliculares. Estos digieren la pared del folículo, permitiendo así la ruptura folicular y la expulsión del complejo cúmulo-corona-ovocito (Figura 9).

FORMACION DEL CUERPO LUTEO

La estructura folicular remanente en el ovario es el cuerpo lúteo, una glándula endocrina por excelencia. Su principal función es la síntesis de hormonas esteroideas (progesterona y E_2), compuestos esenciales para el desarrollo embrionario temprano. También sintetiza compuestos proteicos que son importantes reguladores intraováricos de la función lútea. En los mamíferos, el cuerpo lúteo está formado mayoritariamente por dos poblaciones celulares de distinto tamaño, células lúteas grandes (22-35 μ m) provenientes de las CG posiblemente, y células lúteas pequeñas originadas de la TI (12-22 μ m). La capacidad de síntesis de hormonas esteroideas depende del tipo celular. El cuerpo lúteo es transitorio, y en el humano tiene una vida media de 14 ± 2 días. La involución lútea es estrictamente necesaria para la normalidad (ciclicidad) del proceso reproductivo.

REGULACION DE LA FUNCION REPRODUCTIVA EN LA HEMBRA

La regulación de la función reproductiva en la hembra está dada a tres niveles, siendo los dos primeros intraováricos (Figura 10):

- mecanismo autocrino: un compuesto es producido por un tipo celular y actúa sobre ese mismo tipo celular.

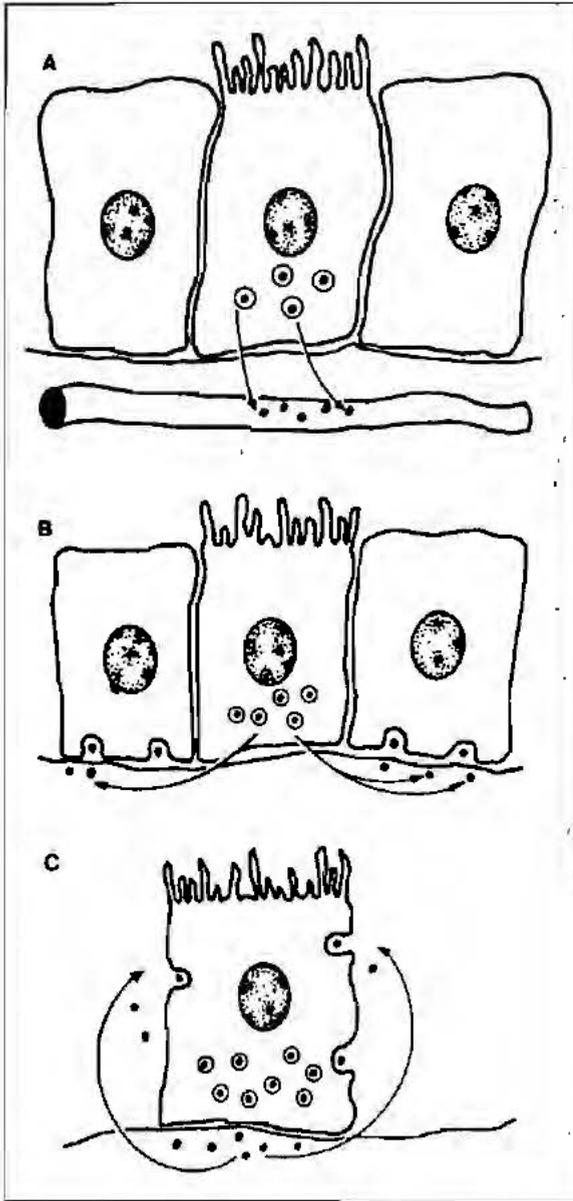


Figura 11. Concentraciones plasmáticas de gonadotropinas y de hormonas esteroidales en un ciclo ovárico normal no concepcional en la mujer.

- mecanismo paracrino: un compuesto producido por un tipo celular actúa sobre una célula vecina pero diferente.
- mecanismo endocrino: una hormona, producida por una glándula endocrina y secretada a la sangre, ejerce su acción en un tejido blanco distante.

Estos tres tipos de mecanismos se interrelacionan, garantizando que el proceso reproductivo en la hembra sea normal.

REGULACION DEL CICLO OVARICO EN LA MUJER

Las gonadotropinas hipofisiarias, LH y FSH, son sintetizadas en la hipófisis anterior. Am-

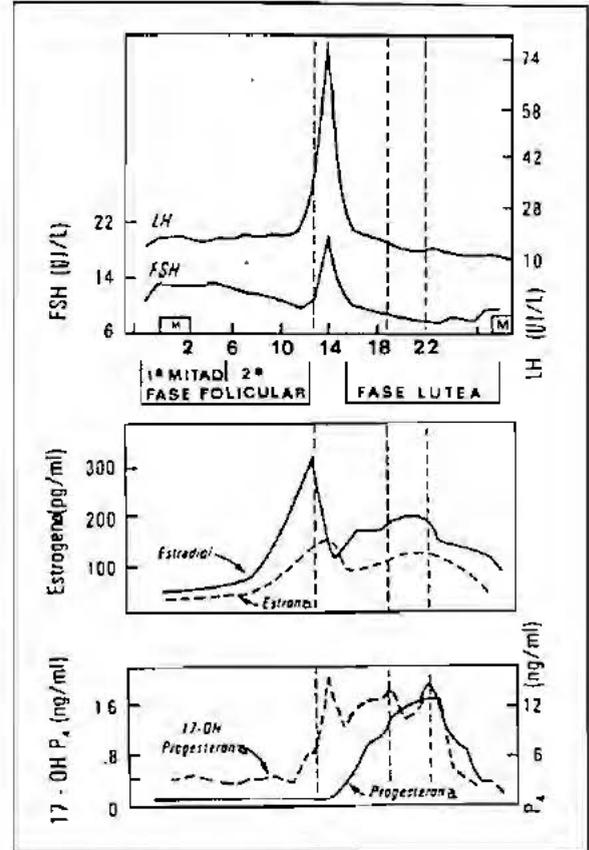


Figura 10. Mecanismos de regulación de la función ovárica. A. Mecanismos endocrinos. B. Mecanismos paracrinos. C. Mecanismos autocrinos.

bas son glicoproteínas formadas por dos subunidades, α y β . La secuencia aminoacídica de la subunidad α de la LH es similar a la de la subunidad α de la FSH; en cambio, las subunidades β son diferentes y propias para cada gonadotropina. Por lo tanto, estas hormonas se unen a sus receptores específicos a través de la subunidad β .

Durante la fase folicular, FSH y LH regulan el desarrollo, maduración y selección del folículo dominante que contiene al ovocito que será fecundado. La concentración de estas gonadotropinas en la circulación periférica es variable (Figura 11); la concentración de FSH es elevada en el momento que ocurre la selección folicular (día 6-8 ciclo), lo que trae consigo un aumento gradual de la síntesis de E_2 , lo que a su vez provoca una inhibición (retroalimentación negativa) de la secreción de FSH. El folículo dominante tiene la capacidad de seguir produciendo E_2 , estimulado por la FSH concentrada en su fluido folicular; la concentración máxima de E_2 es de 300 pg/ml en el día 12 del ciclo.

A diferencia de la FSH, la LH se mantiene baja y uniforme durante la fase folicular media.

Aún así, estimula a las células de la teca a producir andrógenos, y por lo tanto, aumenta el E_2 sintetizado por las CG. El gran aumento de la concentración de E_2 en la sangre periférica estimula la descarga masiva de LH (retroalimentación positiva) por la hipófisis. Esta alza de LH es responsable, a su vez, de numerosos cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en el ovario, y que se han establecido previamente.

Cuando la LH alcanza una concentración aproximada de 30 UI/l (día 12 del ciclo), una señal se gatilla en el folículo preovulatorio que resulta en el cese de la producción de E_2 (y aumento de la 17 hidroxiprogesterona), lo que se refleja en la disminución de la concentración sanguínea de E_2 .

En respuesta a la acción de FSH y LH, el proceso de ovulación comienza en el folículo dominante. Un complejo cúmulo-corona-ovocito se libera 36-38 horas después.

Después de la ovulación, en la fase lútea, las concentraciones de LH y FSH se mantienen bajas; sin embargo, la LH estimula la secreción de

esteroides sexuales, progesterona y E_2 por las células lúteas.

BIBLIOGRAFIA

1. Austin CR, Short RV. (eds): *Reproduction in Mammals: 1. Germ Cells and Fertilization*. Chap. 2. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press 1981; pp 19
2. Erickson J, Hsueh D: *Structure-function relationships during granulosa cell differentiation*. *Endocr Rev* 1987; 8(3): 309
3. Erickson J: *The ovarian androgen producing cells: a review of structure function relationship*. *Endocr Rev* 1985; 6(3): 371
4. Knobil E, Neill JD. (eds): *The Physiology of Reproduction*. Vol. I, Chaps 3, 10, 11, 12, 13, New York: Raven Press 1988
5. Simpson & Sciarra: *Follicular growth and development*. En: Speroff L. (ed): *Gynecology and Obstetrics*. Vol 5, Chap 12. Baltimore: Williams & Williams 1988
6. Sipelak VM: *The microenvironment of the ovarian follicle*. En: Speroff L. (ed): *Contemporary Obstetric and Gynecology*. Baltimore: Williams & Williams 1986

CAPÍTULO 16

BASES CELULARES DE LA FECUNDACION EN MAMIFEROS

R. Smith G.

ASPECTOS GENERALES

La fecundación tiene como objetivos biológicos: 1) la asociación entre dos genomas haploides con formación de un complemento cromosómico diploide; 2) la preservación del genoma diploide, posible gracias a los mecanismos que favorecen la fusión de un solo espermatozoide con el ovocito y previenen la poliespermia y 3) la activación del programa de desarrollo del cigoto, preestablecido en el ovocito y expresado luego del contacto con el espermatozoide.

La fecundación de un ovocito por el espermatozoide, proceso a través del cual se lleva a cabo la reproducción sexual, tiene lugar en la mayoría de los organismos multicelulares y es fundamental para la continuidad de la vida. Tanto en mamíferos como en no mamíferos, en condiciones *in vivo* o *in vitro*, el proceso que conducen a la fusión de los gametos masculino y femenino consiste en una cascada de eventos interdependientes que progresan en forma secuencial y de acuerdo a un orden establecido. Estos eventos incluyen: la capacitación del espermatozoide y su penetración a través de las cubiertas ovocitarias, el reconocimiento especie-específico de ambos gametos, procesos de fusión de membranas intercelulares e intracelulares, modificaciones enzimáticas de las cubiertas celulares y desarrollo de los pronúcleos.

La normalidad de este proceso va a depender fundamentalmente del transporte, morfología, fisiología, vida fértil y constitución cromosómica de ambos gametos.

Hasta ahora, la mayor parte de los conocimientos que se tienen sobre la biología de la fecundación provienen de estudios llevados a cabo en ovocitos de ratón fecundados *in vitro*. No obstante, es muy probable que la estrategia para este proceso sea aplicable también a la fecundación *in vivo* en la mayor parte de los mamíferos, incluida la especie humana.

En el presente capítulo se analizará sólo el proceso de fecundación en mamíferos; sin embargo es importante tener presente la similitud de este proceso entre los mamíferos y otros vertebrados e invertebrados, por ejemplo el erizo de

mar. A pesar que la evolución de la modalidad de fecundación externa a fecundación interna ocurrió en un período estimado en 100 millones de años, muchos de los mecanismos celulares y moleculares involucrados han mostrado notables paralelismos. Este hecho no debe sorprendernos, ya que tanto los objetivos del proceso de fecundación como los actores participantes en el mismo (óvulo y espermatozoide) son similares en el ratón y en el erizo de mar.

CAMBIOS MADURATIVOS DE LOS GAMETOS PRE-FECUNDACION

Para que ocurra la fecundación tanto *in vivo* como *in vitro* es esencial que los gametos, espermatozoides y ovocitos, experimenten una secuencia de cambios madurativos programados que los capacitarán para interactuar.

Ovocitos

Los ovocitos I (o primarios) al estado de vesícula germinativa no pueden ser fecundados normalmente y deben experimentar una serie de cambios críticos que los hace competentes, luego de fecundados, para sustentar un desarrollo normal.

El período comprendido entre el alza de LH y la ovulación está marcado por cambios importantes del complejo cúmulo-corona-ovocito contenido en el folículo preovulatorio (Figura 1). Durante este período, y como consecuencia del estímulo hormonal, el ovocito reactiva la meiosis produciéndose la progresión del estado nuclear desde dictioteno (caracterizado por la presencia de vesícula germinativa) hasta metafase II. En este estado el ovocito es ovulado y fecundado. Este proceso conocido como *maduración del ovocito*, es fácilmente visualizable al microscopio óptico por la presencia del primer corpúsculo polar (polocito I) en el espacio perivitelino. En la mayoría de los mamíferos el gameto maduro fecundable corresponde al ovocito II. El término de la segunda división meiótica ocurrirá en el ovocito una vez que éste ha sido penetrado por el espermatozoide.

A nivel de las células del cúmulo y de la corona, el alza preovulatoria de LH induce a

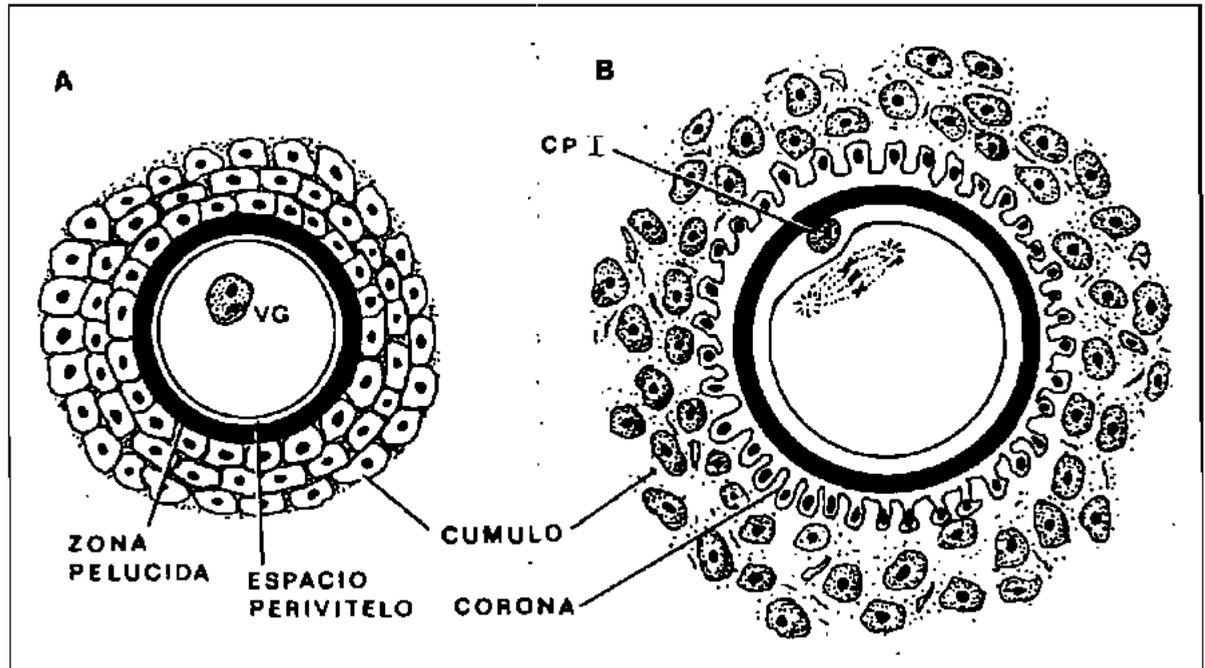


Figura 1. Modificaciones del complejo cúmulo-corona-ovocito. A: antes y B: después de la descarga preovulatoria de LH.

que estas células se disocian y secretan una matriz extracelular rica en glicosaaminoglicanos, en un proceso conocido como mucificación. La *disociación y mucificación de las células del cúmulo* van a facilitar su penetración por los espermatozoides.

Espermatozoides

El espermatozoide de mamífero experimenta una serie de cambios morfofuncionales antes de estar capacitado para fecundar al ovocito. La capacidad de fecundar la adquieren los espermatozoides durante su transporte por el tracto reproductor femenino, luego de completar ciertos cambios celulares y moleculares conocidos como "capacitación". La capacitación incluye no sólo cambios intracelulares, sino también alteraciones en los componentes de superficie de la membrana plasmática del espermatozoide, principalmente en la región acrosomal. Durante este proceso, se produce una desestabilización progresiva de la membrana plasmática del espermatozoide resultante, en un aumento de su permeabilidad a los iones de calcio. Otros cambios que ocurren durante este período incluyen la remoción de proteínas de superficie incorporadas a la membrana plasmática del espermatozoide durante el tránsito epididimario y/o absorbidas desde las secreciones que conforman el plasma seminal. Dado que no existen diferencias morfológicas entre los espermatozoides recién eyaculados "no capacitados" y los "capacitados", los procesos inducidos durante la capacitación

deben ser esencialmente de carácter bioquímico molecular.

La capacitación del espermatozoide humano, al igual que la de otros mamíferos puede llevarse a cabo *in vitro* removiendo los espermatozoides desde el plasma seminal e incubándolos en medios de cultivo relativamente simples.

Como resultado de la "capacitación", se produce un cambio en el patrón de motilidad de los espermatozoides los cuales comienzan a moverse en forma muy vigorosa. Este fenómeno se ha definido como "hiperactivación de la motilidad" y se caracteriza por un batido del flagelo de gran amplitud y baja frecuencia. Esta forma de batir da por resultado un movimiento direccional progresivo del espermatozoide. Actualmente la hiperactivación está reconocida en la mayoría de las especies de mamíferos incluida la humana. Este tipo de movimiento, además de permitir el avance de los espermatozoides, le imprimiría la fuerza propulsora necesaria para penetrar las cubiertas ovulares durante el proceso de fecundación.

Durante la capacitación, el espermatozoide además se prepara para experimentar la *reacción del acrosoma*, la cual constituye un prerrequisito esencial para que ocurra fusión gamética. El acrosoma es un organelo que cubre los dos tercios anteriores de la cabeza del espermatozoide y que se define como un lisosoma modificado y altamente especializado. Esta estructura aparece durante la transformación de la espermátida a espermatozoide como un producto del complejo

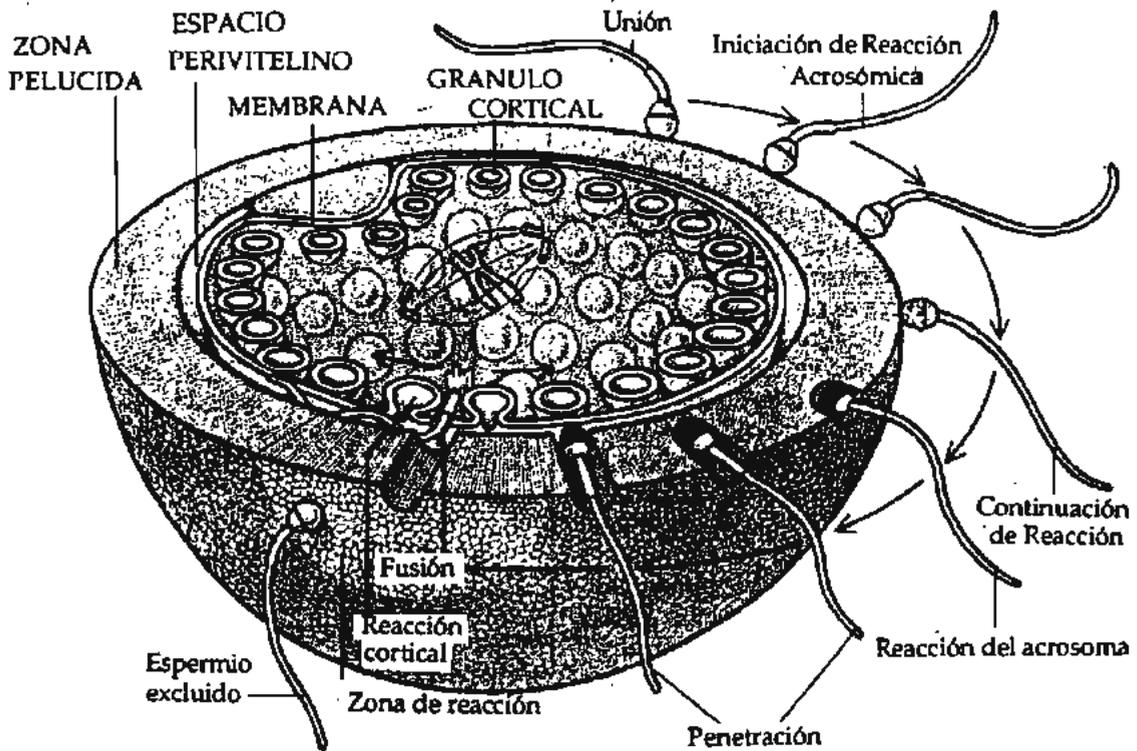


Figura 3. Resumen esquemático de la secuencia de eventos que conducen a la fecundación en mamíferos (Tomado de: Wassarman P: Sci Am Rec 1988).

nantes en su capacidad para penetrar la matriz del cúmulo.

Una vez que el espermatozoide capacitado ha atravesado el cúmulo oóforo, deberá penetrar la zona pelúcida antes de alcanzar el espacio perivitelino. La zona pelúcida constituye un sitio crítico en la interacción del espermatozoide con el ovocito al inicio del proceso de fecundación.

La zona pelúcida es una cubierta glicoproteica, filamentosa, que rodea al ovocito y luego al preembrión antes de su implantación en el útero.

En el ratón, la zona pelúcida está constituida principalmente por tres tipos de glicoproteínas sulfatadas, que se diferencian por sus pesos moleculares y se denominan: ZP1 (200.000) ZP2 (120.000) y ZP3 (83.000). Estructuralmente éstas se organizan en largos filamentos interconectados, dando origen a una estructura porosa de 7 μm de espesor.

Es conocido que la zona pelúcida es la determinante de la especificidad de especie de la fecundación y por lo tanto impide las fecundaciones entre especies diferentes. Por ejemplo, bajo condiciones *in vitro* que permiten la fecundación de ovocitos por espermatozoides de la misma especie, la fecundación por espermatozoides de especies heterólogas no ocurre a menos, que se remueva la zona pelúcida. La

unión de los espermatozoides a la zona está mediada por sitios específicos de unión en la superficie de la zona, complementarios a receptores específicos presentes en la membrana plasmática del espermatozoide.

Recientemente se han podido identificar, aislar y caracterizar estos sitios de unión en la zona pelúcida del ratón y humano. Estos corresponden a la glicoproteína ZP3, la cual a través de sus residuos glicosídicos (PM 3.900) ligados por átomos de oxígeno a la cadena polipeptídica, une en forma específica los espermatozoides a la zona. A nivel del espermatozoide, carbohidratos unidos a proteínas estarían mediando el reconocimiento entre ambos gametos, al interactuar con los residuos de oligosacáridos específicos en la superficie de la zona. Inmediatamente antes de la fecundación, cada espermatozoide se une a la ZP3 a través de la membrana plasmática que recubre el acrosoma. La gran diversidad en composición, secuencias y conformación de la estructura de los oligosacáridos da un enorme número de posibilidades combinatorias, compatible con la especificidad de especie de la interacción espermatozoide-ovocito.

Una vez unidos a la zona pelúcida, los espermatozoides completan la reacción acrosomal (en ratón y probablemente también en hu-

de Golgi. La matriz acrosomal está delimitada por una membrana acrosomal externa que subyace a la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide y una membrana acrosomal interna sobre la membrana nuclear (Figura 2-A). El contenido acrosomal comprende una variedad de enzimas fuertemente hidrolíticas localizadas en la matriz acrosomal o asociadas a la membrana. De estas enzimas, las más estudiadas y caracterizadas son la hialuronidasa y la acrosina.

La reacción acrosómica es un proceso de exocitosis organizado y progresivo, que se caracteriza por la fusión y posterior vesiculación de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa del espermatozoide (Figura 2-B). Se ha sugerido que la liberación y exposición de las enzimas acrosomales durante la reacción del acrosoma facilitarían la penetración de los espermatozoides a través de las células del cúmulo y de la zona pelúcida. Experimentalmente se ha demostrado que sólo aquellos espermatozoides que han completado la reacción acrosomal son capaces de atravesar la zona pelúcida y alcanzar la membrana plasmática del ovocito. Además de lo ya señalado, la reacción del acrosoma a través de un mecanismo no conocido aún, gatillarían un cambio en la organización molecular de la membrana plasmática que recubre el segmento ecuatorial y/o la región post-acrosomal, lo que traería como consecuencia que dicha membrana fuese capaz de fusionarse con la membrana plasmática del ovocito una vez que el espermatozoide ha atravesado la zona pelúcida.

El aumento en las concentraciones de calcio citoplasmático es un requisito esencial para que ocurra la reacción del acrosoma. Se ha planteado que, de manera similar a lo que ocurre en los procesos de fusión de membranas en células somáticas, los lisofosfolípidos jugarían un rol fundamental en la fusión entre las membranas plasmática y acrosomal externa del espermatozoide.

En el ratón y en humano, la evidencia disponible señala que la reacción acrosomal se completa una vez que el espermatozoide se ha unido a la zona pelúcida; por lo tanto en estas especies la zona se comporta como inductora de la reacción acrosómica.

PASO DE LOS ESPERMATOZOIDES POR CUBIERTAS OVOCITARIAS: CELULAS DEL CUMULO Y ZONA PELUCIDA

En los mamíferos la fecundación se lleva a cabo en la porción ampular de las trompas de Falopio. Antes de entrar en contacto con la membrana plasmática del ovocito, los espermatozoides primero deben atravesar las células del cúmulo oóforo y corona radiada, y a continuación la zona pelúcida. El paso de los espermatozoides

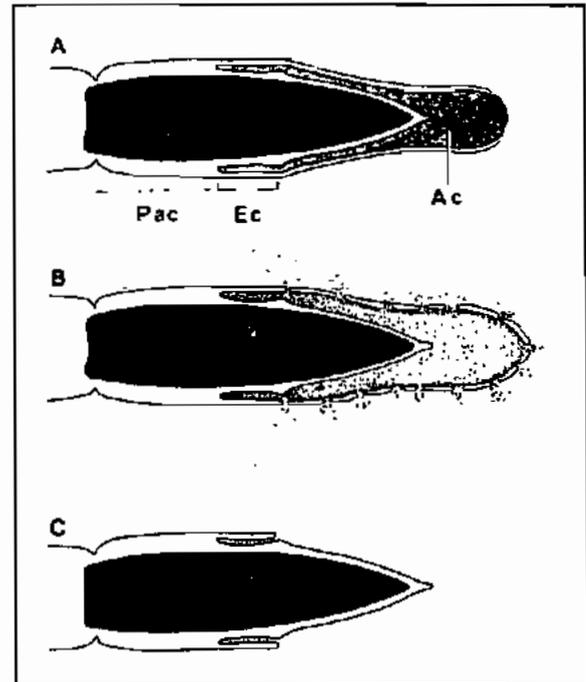


Figura 2. Diagrama que ilustra la reacción del acrosoma en un espermatozoide de mamífero. A. Espermatozoide no reaccionado. Ac = matriz acrosomal. B. Vesiculación del contenido acrosomal y liberación del contenido acrosomal. Ec = segmento ecuatorial. C. Espermatozoide reaccionado. Pac = región postacrosomal.

a través de las células del cúmulo se ve facilitado tanto por la motilidad del propio espermatozoide, como por la acción de enzimas proteolíticas contenidas en el acrosoma o asociadas a la membrana plasmática del espermatozoide.

Tradicionalmente se ha propuesto que la hialuronidasa facilitaría la penetración de los espermatozoides a través de las células del cúmulo, al disolver el material de la matriz extracelular que mantiene estas células asociadas. El hecho que en algunas especies (ratón y humano) el espermatozoide experimente la reacción acrosomal en la superficie de la zona pelúcida, ha hecho dudar de la estricta necesidad de la liberación de hialuronidasa para la penetración a través del cúmulo. Sin embargo, esto no significa que la hialuronidasa sea innecesaria en esta etapa; de hecho, se ha demostrado que inhibidores específicos de la hialuronidasa inhiben la acción dispersante de la enzima y la penetración de las células del cúmulo por espermatozoides de hámster.

Aún cuando no se ha demostrado una interacción específica entre el espermatozoide y la matriz extracelular de las células del cúmulo, éstas sólo pueden ser atravesadas por espermatozoides capacitados y con acrosoma intacto. Aparentemente algunas características de la superficie de los espermatozoides serían determi-

mano), preparándose para penetrar la zona (Figura 3).

La penetración de la zona pelúcida se ve favorecida por una parte, por la fuerza mecánica ejercida por el movimiento flagelar y por otra, por la acción de enzimas acrosomales liberadas o expuestas luego de ocurrida la reacción acrosómica. Se ha sugerido que una proteinasa semejante a la tripsina, conocida como acrosina, es necesaria para el paso de los espermatozoides a través de la zona pelúcida. La acrosina luego de ocurrida la reacción acrosómica, permanece asociada a la membrana acrosomal interna. Múltiples evidencias experimentales demuestran que inhibidores de la acrosina inhiben la fecundación en diversas especies. En hámster se ha visto que, cuando los espermatozoides son incubados en condición *in vitro* por un período prolongado de tiempo (cinco horas o más), pierden la capacidad de atravesar la zona. Este hecho ha sido atribuido a la pérdida gradual de acrosina desde el acrosoma.

Dado el rol esencial de la acrosina para el éxito de la fecundación, la reacción acrosómica del espermatozoide fecundante deberá estar temporalmente asociada con el paso de los espermatozoides a través de la zona pelúcida. Si la reacción acrosomal ocurre prematuramente antes que los espermatozoides alcancen la superficie de la zona, éstos pierden la capacidad de atravesar la células del cúmulo. Si no ocurre reacción acrosómica a nivel de la zona, los espermatozoides en ausencia de enzimas acrosomales no podrán atravesar la zona. Por lo tanto, es probable que este simple evento crucial para la continuación del proceso reproductivo esté bajo un control tanto espacial como temporal. Esta regulación parecería ser una función propia de la ZP que induce la reacción acrosomal.

FUSION ESPERMATOZOIDE-OVOCITO

Una vez que el espermatozoide atraviesa la zona, alcanza el espacio perivitelino y se fusiona con la membrana plasmática del ovocito. Este proceso se ve facilitado por el contacto con las microvellosidades que se proyectan de la superficie ovular.

Se ha postulado que la reacción acrosómica gatillaría un cambio a nivel de la membrana plasmática que cubre el segmento ecuatorial y/o la región post-acrosomal del espermatozoide, permitiendo su fusión con la membrana ovocitaria. La fusión gamética sólo se lleva a cabo en aquellos espermatozoides que han experimentado la reacción acrosomal. La fusión gamética ocurre entre la membrana plasmáti-

ovocitaria, quedando paulatinamente la cabeza del espermatozoide, y a continuación la cola, incorporada en el citoplasma ovular.

Bajo condiciones normales, la fecundación del ovocito por un espermatozoide impide que otros espermatozoides se fusionen a la membrana ovocitaria, evitando de esta manera la poliespermia. La presencia de uno o más complementos cromosómicos extra en el ovocito se conoce como poliploidia. Esta anomalía cromosómica letal se genera como resultado de una poliespermia. Hay un bajo número de espermatozoides (20 a 100) que normalmente alcanzan la ámpula durante la fecundación *in vivo*, y las tasas de poliespermia son bajas. Cuando se trabaja con fecundación *in vitro*, la cual requiere que miles de espermatozoides (10^4 a 10^5 por ovocito) rodeen al ovocito, las fecundaciones poliespérmicas suelen alcanzar hasta un 5%.

EVENTOS POSTFUSION DE MEMBRANAS GAMETICAS

Luego de la fusión inicial de ambos gametos, el ovocito hasta ahora metabólicamente inactivo inicia una serie de cambios morfológicos y bioquímicos, conocidos como *activación del ovocito*. Ellos conducen a la formación y unión de los pronúcleos masculino y femenino.

Reactivación del núcleo del espermatozoide y formación del pronúcleo masculino

Una vez que el espermatozoide inicia su penetración al citoplasma del ovocito, se desensambla la envoltura nuclear y la cromatina del espermatozoide queda expuesta a factores ovulares que favorecen su decondensación. La cromatina nuclear compacta de la cabeza del espermatozoide se expande o decondensa, por la acción de factores citoplasmáticos que promueven la ruptura de los enlaces disulfuro que mantienen la cromatina compactada. Durante este proceso se produce la sustitución de las histonas específicas del espermatozoide o protaminas por histonas probablemente derivados del ovocito. A continuación se forma una nueva envoltura nuclear en torno a la cromatina ahora expandida, constituyéndose de esta manera el pronúcleo masculino. En la Figura 4 se esquematizan las etapas tempranas del ingreso del espermatozoide al citoplasma del ovocito. La capacidad de un ovocito para inducir la decondensación de la cromatina espermática es dependiente de su estado de maduración. Por ejemplo, ovocitos inmaduros al estado de vesícula germinativa no son capaces

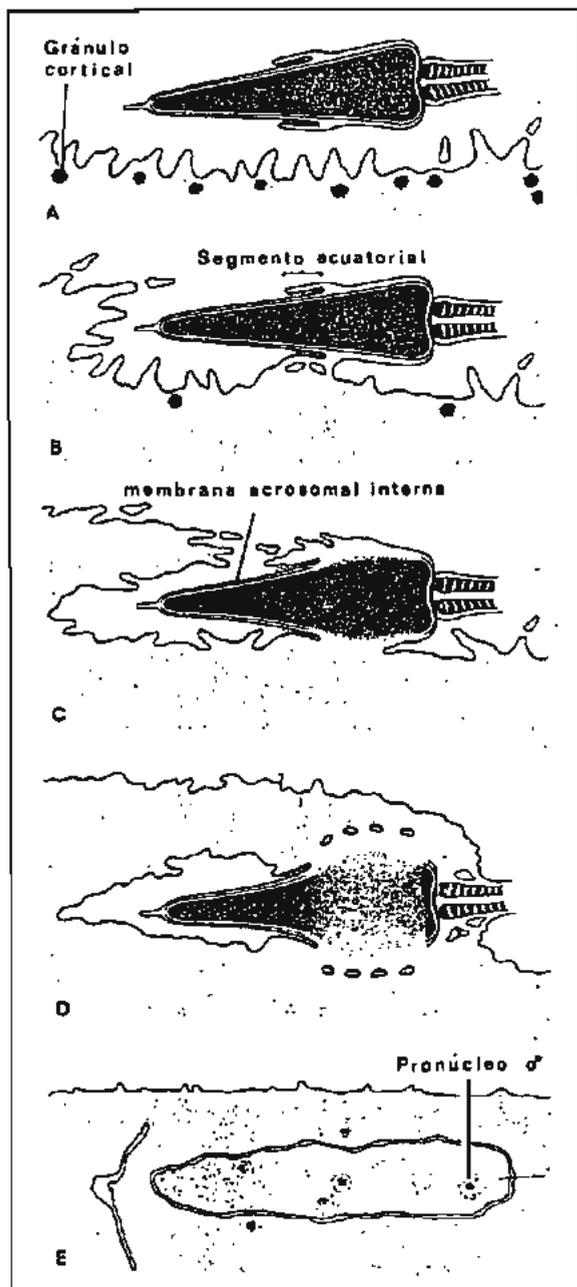


Figura 4. Secuencia de eventos involucrados en la fusión e incorporación del espermatozoide fecundante al ovocito de mamífero. A-B. Espermatozoide en el espacio perivitelino y fusión de la superficie que recubre el segmento ecuatorial con la membrana ovocitaria. C-D. Desaparición parcial de la envoltura nuclear y decondensación de la cromatina espermática en el citoplasma ovular. E. Formación de nueva envoltura nuclear en torno a la cromatina decondensada del núcleo espermático (Modificado de Yanagimachi y Noda: *Am J Anat* 1970; 128: 429).

pueden ser fecundados. Esta capacidad la adquiere el ovocito luego de la ruptura de la vesícula germinativa, y alcanza el máximo en ovocitos maduros en metafase II.

Una vez formado el pronúcleo, éste sintetiza DNA, preparándose para la primera división mitótica del desarrollo embrionario.

Activación del ovocito

La fusión del espermatozoide con el ovocito desencadena una serie de cambios en la composición iónica del gameto femenino. Estos cambios, que fueron reconocidos por primera vez estudiando la fecundación en el erizo de mar, sirven de señal tanto para la activación del ovocito como para la prevención de la poliespermia.

Antes de la fecundación el ovocito es metabólicamente inactivo, no sintetiza DNA y la síntesis de RNA y proteínas es muy baja. El proceso de activación comprende una serie de cambios en la concentración iónica del ovocito, que van a conducir al reinicio de la síntesis de DNA, seguido de segmentación o clivaje. En este sentido el espermatozoide actúa como un gatillador del programa de desarrollo que está presente en el ovocito desde antes de la fecundación.

Los mecanismos conducentes a la activación del ovocito han sido bien estudiados en invertebrados, particularmente en erizo de mar. La fusión gamética provoca una liberación explosiva de calcio desde sitios de almacenamiento intracelular (ejemplo: retículo endoplásmico). Este aumento del calcio citosólico resulta en un intercambio de Na^+/H^+ a través de la membrana, que conduce finalmente a un aumento del pH intracelular. El aumento transiente del pH permitiría remover o enmascarar proteínas inhibitorias en el citoplasma ovular, resultado en una activación irreversible de las vías oxidativas del ovocito, del metabolismo de lípidos, formación de NADH y síntesis de proteínas y DNA.

La reacción cortical, la reacción de la zona pelúcida y la formación del pronúcleo femenino constituyen eventos tempranos, que se producen como consecuencia de la activación del ovocito por el espermatozoide fecundante.

Reacción cortical

Como se mencionó en el capítulo anterior, los gránulos corticales aparecen por primera vez durante la fase de crecimiento ovocitario, y como producto del complejo de Golgi. Estos organelos similares a los lisosomas, poseen un diámetro de 200 a 600 nm, y aumentan en número a medida que el ovocito crece. En un ovocito de ratón pueden reconocerse alrededor de 4.000 gránulos corticales, número bastante inferior a los 15.000 gránulos corticales que posee el óvulo de erizo de mar, y a pesar que el diámetro de ambas células es muy similar.

En el proceso conocido como reacción cortical, los gránulos corticales se fusionan con la

membrana plasmática del ovocito y su contenido es liberado al espacio perivitelino (Figuras 3 y 5). Esta fusión de membranas se propaga como onda, desde el punto de fusión del espermatozoide hasta el polo opuesto del ovocito. Este proceso es dependiente de la liberación de Ca_2^+ desde sitios de almacenamiento intracelular.

Reacción de la zona pelúcida

Como resultado de la exocitosis de los gránulos corticales, su contenido (compuesto principalmente por proteinasas y peroxidasas) se asocia a la zona pelúcida, provocando un cambio en sus propiedades físico-químicas que previene la entrada de otros espermatozoides. Este mecanismo de bloqueo a la poliespermia se conoce como *reacción de la zona* (Figuras 3 y 5).

La reacción de la zona puede manifestarse en una inactivación de los receptores de la zona para la unión de los espermatozoides, y/o en un aumento de la resistencia de la zona a su disolución por enzimas u otros agentes utilizados con este propósito. Esta modificación en la solubilidad de la zona como consecuencia de la reacción cortical, es indicativa de cambios en las características moleculares de la zona después de la fecundación. La inactivación de receptores para espermatozoides en la superficie de la zona impedirá la unión de nuevos espermatozoides al ovocito fecundado. El aumento en la resistencia de la zona a su disolución la hará refractaria a la penetración espermática. A pesar de este complejo mecanismo, alrededor del 5% de los ovocitos humanos fecundados *in vitro* presentan tres pronúcleos (triploides), y los dos tercios de éstos pareciesen ser fecundados por dos espermatozoides. La poliespermia se origina principalmente por alteraciones en la maduración del ovocito. La inseminación de ovocitos inmaduros, hipermaduros o envejecidos (sobrepasado el período de vida fértil) se correlaciona con una alta incidencia de ovocitos triploides (28%). Otros factores críticos para evitar la penetración de múltiples espermatozoides al ovocito *in vitro* son: el número de espermatozoides usados para la inseminación, la duración del contacto entre los gametos y el pH del medio de cultivo utilizado para la fecundación.

Aún cuando morfológicamente la zona pelúcida de un ovocito fecundado es similar a la de un ovocito no fecundado, las ZP3 aisladas de ovocitos fecundados (ZP3f) no se comportan ni como receptores para espermatozoides ni como inductores de la reacción acrosomal *in vitro*.

Se debe tener presente que el mecanismo utilizado para bloquear la poliespermia depende finalmente de la especie. Es así como en algunas especies, entre éstas humano, ratón, hámster,

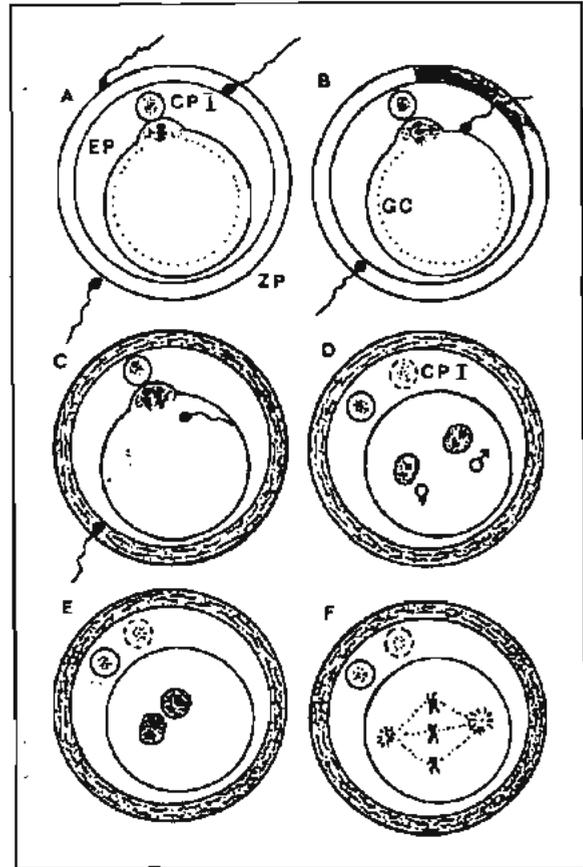


Figura 5. Diagrama que muestra las etapas del proceso de fecundación en mamíferos. La secuencia de eventos incluye: A. Liberación del primer corpúsculo polar (CPI). Unión y penetración del espermatozoide a la zona pelúcida (ZP). B. Inicio de la reacción cortical y reacción de la zona. GC = gránulos corticales. C. Penetración del espermatozoide al citoplasma ovular. ZPF = ZP de ovocito fecundado. D. Expulsión del segundo corpúsculo polar (CPII) y formación de los pronúcleos masculino (o) y femenino (o). E. Aproximación de los pronúcleos y desaparición de las envolturas pronucleares. F. Metafase de la primera división de segmentación.

etc., la zona pelúcida es la responsable del bloqueo primario a la poliespermia. En el conejo en cambio, el bloqueo se produce a nivel de la membrana plasmática. En el conejo es posible visualizar por microscopio óptico numerosos espermatozoides en el espacio perivitelino. Por otra parte, el erizo de mar utiliza dos mecanismos de bloqueo a la poliespermia: un bloqueo rápido y transiente (tres segundos después de la fecundación) que opera a través de la depolarización de la membrana plasmática, y un bloqueo lento y permanente (un minuto de fecundación) resultante de la transformación de la membrana vitelina en membrana de fecundación.

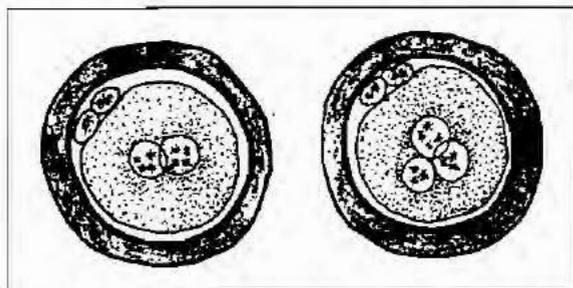


Figura 6. A. Fecundación normal. B. Fecundación anormal: triploide.

Formación del pronúcleo femenino

El conjunto de cromosomas, presentes en el ovocito luego que se completa la primera división meiótica, se va a transformar en el pronúcleo femenino una vez que la meiosis finaliza (Figura 5). El término de la meiosis está marcado por la expulsión del segundo corpúsculo polar, el cual contiene la mitad de los cromosomas del ovocito (n). Los cromosomas restantes permanecen en el citoplasma y experimentan decondensación. A continuación se forma una nueva membrana pronuclear en torno al ahora material nuclear decondensado del ovocito (Figura 5-D). Debido al gran tamaño del ovocito, ambos pronúcleos deben migrar para aproximarse entre sí. Al mismo tiempo, se lleva a cabo la síntesis de DNA en ambos conjuntos haploides. Cuando ambos pronúcleos alcanzan el centro del ovocito, se desintegran las membranas de los pronúcleos masculino y femenino, y los cromosomas se ordenan en forma inmediata durante la metafase del huso mitótico en desarrollo, preparándose para la primera división de segmentación (Figura 5-F). En mamíferos, a diferencia de lo que ocurre en erizo de mar, los dos pronúcleos no se fusionan directamente; ellos se aproximan uno al otro, permaneciendo cada conjunto cromosómico como una entidad individual hasta la ruptura de las membranas pronucleares. Mediante el uso de anticuerpos (conjugados con fluorescencia) contra componentes del citoesqueleto, microtúbulos y microfilamentos, se ha podido demostrar que éstos juegan un rol fundamental en la incorporación del espermatozoide al citoplasma ovular, en el término de la meiosis y en la migración y aposición de los pronúcleos.

Ambos pronúcleos presentan características morfológicas semejantes y son indistinguibles el uno del otro. Cuando se fecunda el ovocito humano *in vitro*, transcurren alrededor de 12 horas entre la inseminación y la formación de los pronúcleos.

La fecundación sólo puede ser demostrada en forma inequívoca cuando se cumplen los siguientes criterios: presencia de dos pronúcleos, presencia de dos corpúsculos polares y

presencia de la cola del espermatozoide en el citoplasma ovular (Figura 6).

CONSIDERACIONES FINALES

La fecundación no es un evento único sino un proceso, en el cual es posible reconocer una secuencia de eventos que van desde la interacción del espermatozoide con la zona pelúcida hasta la aparición de los pronúcleos; por lo tanto es difícil determinar el momento mismo de la fecundación. Desde una visión morfológica-estructural, el término de la fecundación estaría marcado por la desaparición de ambas envolturas pronucleares y la distribución de los complementos cromosómicos paterno y materno en la placa metafásica conducente al primer clivaje. Alrededor de las 30 horas después de la fusión de los pronúcleos tiene lugar la primera división de segmentación. Así, los eventos conducentes al primer clivaje son enteramente dependientes del genoma materno.

La regulación precisa de los procesos que conducen a la maduración de los gametos y a su encuentro en el sitio de la fecundación, así como también el control de los eventos intrínsecos en el ovocito que conducen a la asociación de los pronúcleos, permitirán que la fecundación tenga como resultado el desarrollo de un embrión normal.

Fecundación *in vitro*

La fecundación extracorpórea con transferencia de embrión al útero materno en mamíferos fue demostrada por primera vez hace aproximadamente 30 años. Los primeros intentos que se realizaron para fecundar ovocitos humanos *in vitro* fueron reportados por un grupo de científicos ingleses al inicio de la década de los 70. En agosto de 1978, en un acontecimiento considerado un milagro de la Medicina, nació Louise Brown, primera niña concebida *in vitro*. Desde entonces han nacido por este procedimiento alrededor de 18.000 niños en todo el mundo y varias decenas de ellos en Chile.

La fecundación *in vitro* humana constituye una modalidad terapéutica cuyo objetivo es resolver la ausencia de hijos en parejas que no pueden concebir, y que han sido tratadas previamente por métodos más conservadores. La fecundación *in vitro* constituye el procedimiento de elección principalmente cuando existe:

- Patología tubaria que impide el transporte normal de ambos gametos y su interacción en el ámpula del oviducto.
- Factor masculino en que el varón produce un bajo número de espermatozoides (oligozoospermia) o espermatozoides de baja motilidad (astenozoospermia).

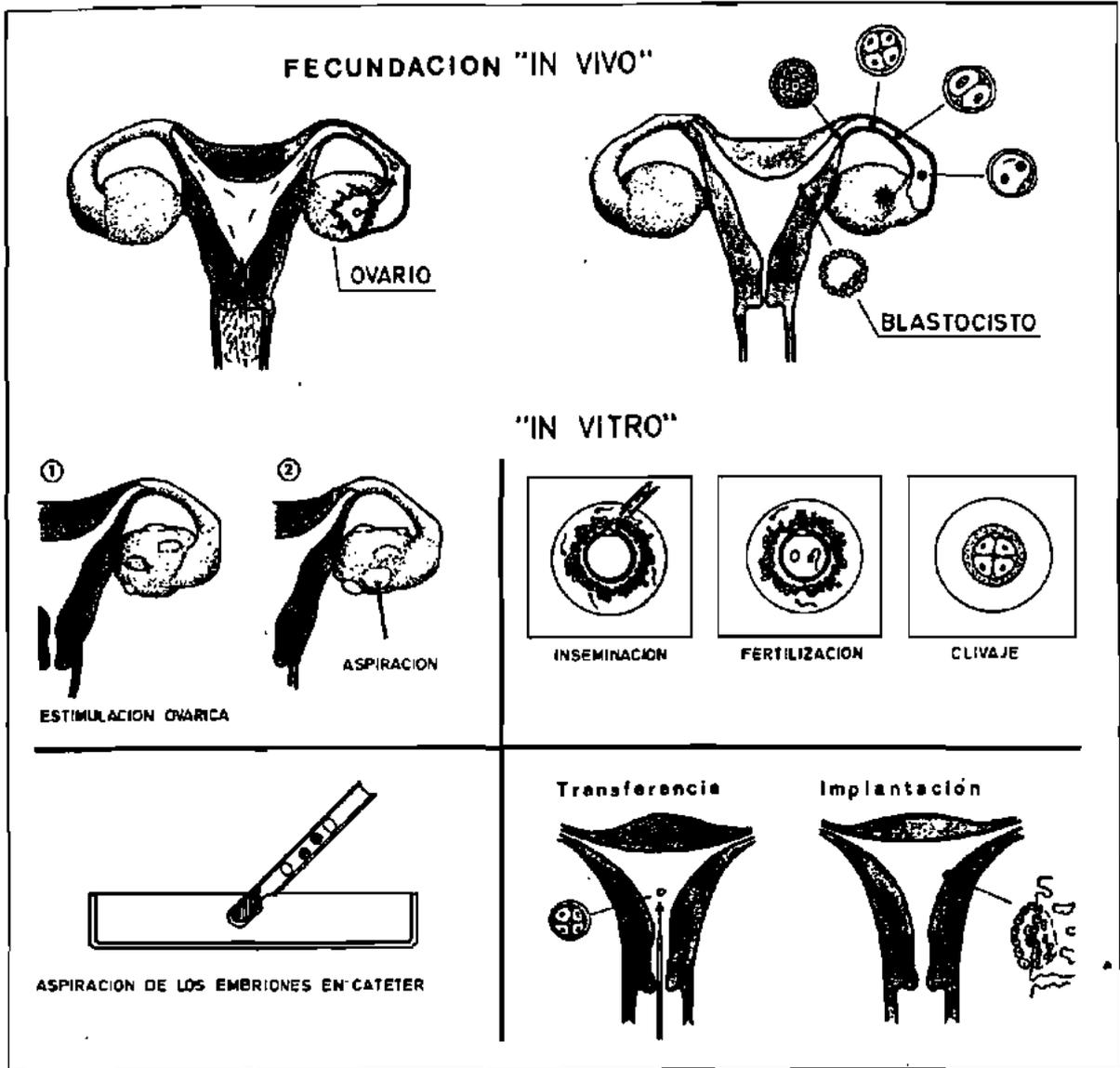


Figura 7. Comparación entre la fecundación *in vivo* con la fecundación *in vitro*.

- Desórdenes inmunológicos.
- Endometriosis.
- Infertilidad de causa no precisada.

En la Figura 7 se compara la fecundación *in vivo* con la fecundación *in vitro*. Durante la fecundación *in vivo*, un ovocito es liberado del folículo durante cada ciclo ovárico, captado por la fimbria del oviducto y transportado hacia el ampulla. De los millones de espermatozoides depositados en la profundidad de la vagina durante la relación sexual, sólo unos pocos alcanzan el ampulla donde uno de ellos fecunda al ovocito. El cigoto inicia su desarrollo a medida que avanza por la trompa en dirección al útero. Al tercer día después de la fecundación, el preembrión al estado de mórula pasa a la cavidad uterina donde se lleva a cabo la diferenciación del blastocito. Durante el curso del día 6 ó 7 después de la

fecundación tiene lugar la implantación del blastocito en el endometrio uterino.

Durante la fecundación *in vitro*, y mediante la administración de hormonas o sus análogos que estimulan el proceso reproductivo y se induce la selección, crecimiento y maduración de varios folículos. La captura del ovocito se realiza momentos antes que se produzca la ruptura folicular. Cada folículo preovulatorio es puncionado; aspirando por la vía laparoscópica o transvaginal, su contenido es transportado a un laboratorio, donde se aíslan e identifican los complejos cúmulo-corona-ovocito, procediéndose luego a clasificarlos de acuerdo a su estado de madurez. Con el objeto de asegurar la recuperación de ovocitos maduros fecundables (en metafase II), el desarrollo folicular debe ser estrechamente monitoreado me-

diante seguimientos hormonales y ecográficos que aseguren que los folículos han alcanzado niveles hormonales y un diámetro adecuado.

En forma aparte se preparan los espermatozoides del cónyuge. Con el objeto de disponer de una población de espermatozoides similar a la que *in vivo* interactuaría con el ovocito, a partir de la muestra de semen del marido se seleccionan para la inseminación aquellos espermatozoides que demuestran mejor motilidad y morfología. Cada complejo cúmulo-corona-ovocito es inseminado con aproximadamente 25.000 espermatozoides en medios de cultivo que contienen sales, sustratos energéticos y proteínas necesarias para la sobrevivencia de los gametos, para la fecundación y crecimiento del embrión temprano. Luego de 20 horas de incubación en estufa estéril a pH 7,0 con temperatura y humedad controlados, se verifica mediante un microscopio óptico invertido si ha ocurrido la fecundación.

El diagnóstico de fecundación normal se realiza usando como criterios la presencia de dos pronúcleos y dos corpúsculos polares (estadio de pronúcleo). Luego de 2 días de incubación, los preembriones al estado de 4 blastómeros son colectados en un catéter y posteriormente transferidos a la cavidad uterina para su implantación y consecuente desarrollo hasta el nacimiento. Deberán transcurrir alrededor de siete días para comprobar a través de pruebas hormonales si existe embarazo.

En los últimos años se han desarrollado diversos otros procedimientos de reproducción asistida, que constituyen variaciones del anterior. Estos procedimientos incluyen el:

- GIFT o transferencia intratubaria de los gametos.
- PROST o transferencia intratubaria de cigotos (estadios de pronúcleos).
- TET o transferencia intratubaria de embriones.
- TTTI o transferencia de espermatozoides lavados a las trompas de Falopio.

Algunos de estos procedimientos parecen ser más fisiológicos y exitosos que otros. Es el caso del GIFT, donde se transfieren a la trompa espermatozoides y ovocitos y por lo tanto la fecundación y el desarrollo temprano del preembrión ocurren en su ambiente natural. Sin embargo, es necesario considerar que esta metodología no permite determinar si ha ocurrido la fecundación como tampoco permite diagnosticar la normalidad del proceso.

La aplicación de uno u otro procedimiento dependerá de la causa de la infertilidad. Es así como el GIFT sólo podrá ser practicado en pacientes con trompas normales y sanas.

El desarrollo de las técnicas de fecundación *in vitro* no sólo ha permitido que parejas infértiles puedan lograr el embarazo deseado sino también ha contribuido de manera importante al progreso de la Medicina Reproductiva. En el campo de la Biología la mayor parte de los conocimientos que tenemos actualmente acerca de los eventos celulares y moleculares que ocurren antes y durante la fecundación no hubiesen sido posibles si no contáramos con esta metodología. Gran parte del misterio del inicio de la gestación ha sido revelado por las investigaciones relacionadas con la fecundación *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD: Fertilization. En: *Molecular Biology of the Cell*. 2nd ed. New York, London: Garland Publishing Inc 1989
2. Llanos M: La reacción acrosómica en espermatozoide de mamífero. Aspectos bioquímicos. *Arch Biol Mol Exp* 1989; 22: 25
3. Saling P: How the egg regulates sperm function during gamete interaction: facts and fantasies. *Biol Reprod* 1991; 44: 246
4. Vigil P: Fecundación en mamíferos. *Actual Ginecol Obstet* 1990; 3(4):
5. Wassarman P: The biology and chemistry of fertilization. *Science* 1987; 235: 553
6. Yanagimachi R: Mammalian fertilization. En: Knobil E, Neill J. (eds): *The Physiology of Reproduction*. Vol I. New York: Raven Press 1988

Material Complementario

Clase

Martes 17 de Enero de 2006

“GENOTIPOS, FENOTIPOS Y AMBIENTE”

“LOS PRINCIPIOS MENDELIANOS DE LA HERENCIA”.

Profesora: LAURA WALKER B.

GENOTIPOS, FENOTIPOS Y AMBIENTE.

LOS PRINCIPIOS MENDELIANOS DE LA HERENCIA.

PROFESORA: LAURA WALKER B.

I.- OBJETIVOS:

- Comprender y aplicar el concepto de herencia particulada y los principios de segregación y de asociación independiente de los genes, formulados por Mendel.
- Comprender las relaciones entre genotipo, fenotipo y ambiente, así como, el concepto de norma de reacción.

II.- CONTENIDOS PRINCIPALES:

- Los experimentos de Mendel y las reglas o generalizaciones que de ellos emergen.
- Universalidad de los principios mendelianos.
- Los conceptos de: genotipo, fenotipo, locus, gen, genes alelos, homocigoto, heterocigoto, dominancia, recesividad.
- Las relaciones entre genotipo, fenotipo y ambiente. La norma de reacción de un genotipo.

III.- BIBLIOGRAFÍA:

- Ayala FJ y Kiger J. 1984. Genética Moderna. Fondo Educativo Interamericano.
- Cummings MR. 1995. Herencia Humana. Principios y Conceptos. McGraw-Hill - Interamericana de España. Tercera Edición. 661 pp.
- Navarro J. y Spotorno AE. 1998. "Mendelismo", pp. 23-45. En: Problemas de Genética, ed. LI Walker, Editorial Universitaria, 358 pp.
- Thompson MW, McInnes RR y Willard HF. 1996. En: Thompson & Thompson: Genética en Medicina. Masson S.A. Cuarta Edición.
- Spotorno AE y Navarro J. 1993. "Principios de genética mendeliana", pp. 203-214. En: Elementos de Biología Celular y Genética, eds. AE Spotorno y G Hoecker. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina Universidad de Chile.

NOTA: Las imágenes de esta Sesión, con excepción de las Figuras 7, 8, 9 y 10, fueron tomadas de la versión en la red de Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC., Gelbart WM. 2000. "An Introduction to GENETIC ANALYSIS", Seventh Edition, WH Freeman and Company, New York, USA.

IV.- DESARROLLO:

1.- LOS EXPERIMENTOS Y PRINCIPIOS DE MENDEL

Johann Gregor Mendel nació en 1822 en Moravia, una región que actualmente forma parte de la República Checa. Fue un estudiante aventajado, pero la pobreza de su familia le impidió iniciar una carrera universitaria. A los 21 años ingresó al convento de los agustinos en la ciudad de Brno, no porque tuviera vocación para el sacerdocio sino para contar con ayuda económica que le permitiera seguir estudios universitarios sobre historia natural. Así, al concluir sus estudios monásticos Mendel (Figura 1) se incorporó a la Universidad de Viena, una de las más prestigiadas del mundo en esa época, donde estudió Física, Matemáticas, Química, Ciencias Naturales y Estadística, disciplinas todas que aplicó en el diseño e interpretación de sus experimentos.



Figura 1.- Gregorio Mendel (1822 - 1884), cuando era abad del convento en Brno. (Museo de Moravia en Brno, República Checa)

El éxito de Mendel en aclarar los mecanismos de la herencia no fue el resultado de la suerte ni de un hecho fortuito, sino las consecuencias de la elección de un material biológico adecuado, la realización de experimentos cuidadosamente programados y un análisis brillante de los resultados obtenidos. Para elegir un organismo experimental, Mendel estudió durante dos años varias especies vegetales, intentando averiguar cual era la más apropiada para realizar estudios de herencia.

De este trabajo concluyó que la arveja de jardín (*Pisum sativa*) era la especie que mejor se acomodaba a sus objetivos, ya que las plantas crecían fácilmente, se reproducían por autofecundación y también por fecundación cruzada, ocupaban poco espacio, permitiéndole entonces cultivarlas en el pequeño jardín del monasterio (Figura 2), y tenían un ciclo de vida corto lo que le permitiría estudiar varias generaciones.



Figura 2.- Jardín del monasterio en el que Mendel realizó sus experimentos. Hoy forma parte de un museo y en él se han plantado begonias de flores rojas y blancas en una ordenación que representa gráficamente los resultados obtenidos por Mendel en un cruzamiento de monohibridismo. Aparecen los fenotipos de los padres, F_1 y F_2 (primera, segunda y tercera fila, respectivamente) y F_3 (las filas restantes, representadas en sentido vertical).

Decide además que los caracteres a estudiar debían ser fácilmente identificables, presentar sólo dos formas alternativas, cada una de ellas claramente definidas, y ser constantes a lo largo del tiempo. Utilizando estos criterios, escogió para su análisis siete caracteres distintos, los que tenían relación con las semillas, vainas, flores y tallos de las arvejas (Figura 3 y Tabla 1).

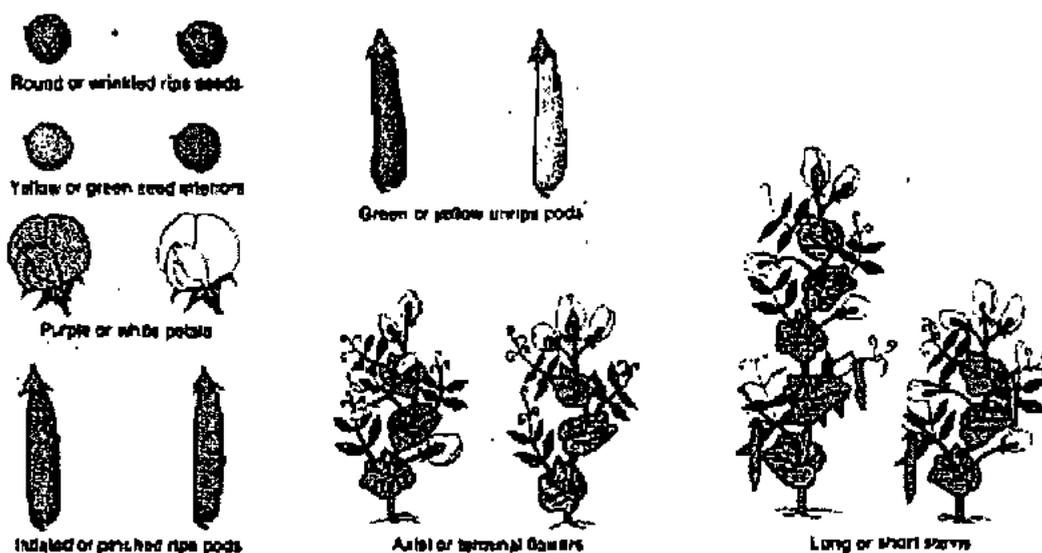


Figura 3.- Los siete caracteres de *Pisum sativa* utilizados por Mendel en sus experimentos

Tabla 1.- Los siete caracteres estudiados por Mendel, mostrando las alternativas de cada uno de ellos.

Carácter	Alternativas del Carácter	
Textura de la Semilla	Lisa	Rugosa
Color del albumen de la semilla	Amarillo	Verde
Color de la flor	Roja	Blanca
Forma de las vainas maduras	Lisa	Constreñida
Color de las vainas inmaduras	Verde	Amarilla
Posición de las flores	Axial	Terminal
Longitud del tallo	Alto (1.9 m – 2.2 m)	Corto (0.24 m – 0.46 m)

El éxito de los experimentos de Mendel, realizados durante nueve años (1854 – 1863), se explica principalmente porque:

- realizó una selección adecuada del material biológico y de los caracteres a investigar
- estudió la transmisión de cada carácter escogido por separado, haciendo abstracción de los caracteres restantes. Sólo una vez que interpretó los resultados de estos **cruzamientos de monohibridismo**, estudió la transmisión de dos caracteres a la vez, **cruzamientos de dihibridismo**, y posteriormente de tres o más caracteres a la vez, polihibridismo.
- siguió la transmisión de los caracteres escogidos por varias generaciones (4 a 6), analizando un gran número de individuos (12.835 plantas fueron examinadas cuidadosamente) ya que pensaba que cuanto mayor fuera el número de individuos analizados, menor sería el riesgo que aparecieran errores causados por el azar.
- empleó métodos estadísticos para el análisis de sus resultados: contó los descendientes obtenidos en cada generación, los agrupó por clases, calculó proporciones obtenidas y esperadas según sus hipótesis. Esta metodología le permitió hacer **generalizaciones y predicciones**, que posteriormente pudo comprobar experimentalmente. **Es el primer investigador que aplica métodos estadísticos en el análisis de resultados experimentales.**

El objetivo de los experimentos, realizados sistemáticamente para cada uno de los siete caracteres seleccionados, fue según afirma Mendel “observar la forma en que cada par de caracteres diferentes se presenta en la descendencia y deducir la ley según la cual éstos aparecen en las generaciones sucesivas”.

El procedimiento seguido en todos los experimentos realizados fue siempre el mismo, como también lo fueron los resultados obtenidos. Mendel introduce una notación simbólica para nominar las generaciones y la constitución genética (**genotipo**) de los individuos. Así, para cruzamientos de monohibridismo el procedimiento, los resultados obtenidos y la notación utilizada, fueron los siguientes:

- a) **obtención de líneas puras** para el carácter en estudio (color de las semillas), mediante autopolinización de las plantas por varias generaciones. Una línea pura es aquella cuyos componentes al ser cruzados entre sí sólo dan individuos de una clase (plantas de semillas amarillas que sólo dan plantas de semillas amarillas y plantas de semillas verdes que sólo dan plantas de semillas verdes).
- b) **Cruzamiento de las líneas puras entre sí** (por fecundación cruzada):
 P (padres): semillas amarillas x semillas verdes.
 F₁ (filial 1): todas amarillas

c) **Cruzamiento de F_1 entre sí** (por autopolinización):

$$F_1 \times F_1$$

F_2 : amarillas (75 %) y verdes (25%)

d) **Cruzamiento de F_2 entre sí** (por autopolinización): $F_2 \times F_2$

F_3 :

1/3 de las plantas de semillas amarillas sólo dan plantas de semillas amarillas
 2/3 de las plantas de semillas amarillas repiten la proporción obtenida en la F_2
 todas las plantas de semillas verdes sólo dan plantas de semillas verdes

Mendel obtiene los mismos resultados para los siete caracteres analizados (Tabla 2): la F_1 fue siempre de una sola clase y la F_2 dio dos tipos de individuos en proporción 3 : 1.

Tabla 2.- Resultados obtenidos por Mendel en los cruzamientos de monohibridismo.

Fenotipos parentales	Fenotipos de F_1 (100%)	Fenotipos de F_2 (75% : 25%)	Proporciones de F_2
Semillas lisas x rugosas	Lisas	5474 lisas, 1850 rugosas	2.96:1
Semillas amarillas x verdes	Amarillas	6022 amarillas, 2001 verdes	3.01:1
Flores rojas x blancas	Rojas	705 rojas, 224 blancas	3.15:1
Vainas lisas x constreñidas	Lisas	882 lisas, 299 constreñidas	2.95:1
Vainas verdes x amarillas	Verdes	428 verdes, 152 amarillas	2.82:1
Flores axiales x terminales	Axiales	651 axiales, 207 terminales	3.14:1
Tallos largos x cortos	Largos	787 largos, 277 cortos	2.84:1

Del conjunto de resultados obtenidos de los cruzamientos de monohibridismo Mendel concluye:

- para cada carácter en estudio, siempre una de las alternativas se comporta como **dominante** y la otra como **recesiva**. En el ejemplo aquí desarrollado toda la F_1 fue de semillas amarillas (dominante), pero las plantas parecen tener "escondida" la alternativa para verde (recesiva), ya que cuando la F_1 se autofecunda, en F_2 aparece un 25% de individuos de semillas verdes.
- los caracteres en estudio están determinados por **factores**, actualmente **genes**, los que se transmiten a la descendencia a través de los gametos. No se heredan los caracteres sino que los factores o genes que los determinan.
- los factores se encuentran siempre de a pares: las plantas de F_1 eran híbridas, actualmente **heterocigotas**, pues poseen un factor para amarillo y otro para verde. Los individuos amarillos y verdes puros, actualmente **homocigotos**, también poseen dos factores para el color de las semillas, pero estos factores son iguales. Las parejas de factores o genes que determinan un carácter se denominan actualmente **alelos**. Trabajos posteriores de otros autores demostraron que los miembros de las parejas de alelos ocupan los mismos sitios o **loci** en los cromosomas homólogos.
- los factores segregan en la gametogénesis del heterocigoto, formando gametos que portan ya sea el factor para amarillo o para verde, en igual número. Actualmente se sabe que la base citológica de este principio se encuentra en el comportamiento de los cromosomas en la Anafase I de la meiosis,

ya que cuando los miembros de una pareja de homólogos se separan, los alelos transportados por ellos también se separan unos de otros.

Con estas conclusiones Mendel formula su primera generalización o **primer principio mendeliano**, llamado de **la segregación**. "Los caracteres están determinados por pares de factores o genes, que se comportan como partículas discretas, manteniendo su individualidad y segregando en los gametos. Los gametos son siempre puros (llevan sólo un miembro de cada par de factores o de alelos).

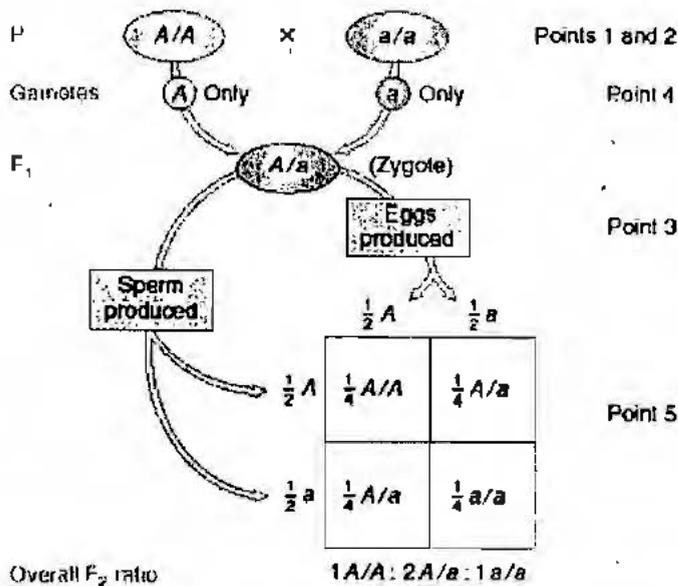


Figura 4.- Modelo mendeliano de la herencia, basado en la existencia de factores. Se ilustra la transmisión de los factores A - a (genes) que determinan el carácter color de las semillas, en las generaciones P, F_1 y F_2 . A = amarillo; a = verde.

Cruzamiento de prueba para el principio de segregación:

Para poner a prueba su hipótesis Mendel cruza las plantas F_1 de semillas amarillas, que según la hipótesis deben ser heterocigotas, con planta de semillas verdes que deben ser homocigotas. Espera obtener en la descendencia individuos de semillas amarillas y verdes en una proporción de 1: 1. En este experimento Mendel obtuvo 58 plantas de semillas amarillas y 52 de semillas verdes, una aproximación muy cercana a la proporción 1 : 1 predicha, confirmando así su hipótesis sobre la segregación de los factores (Figura 5).

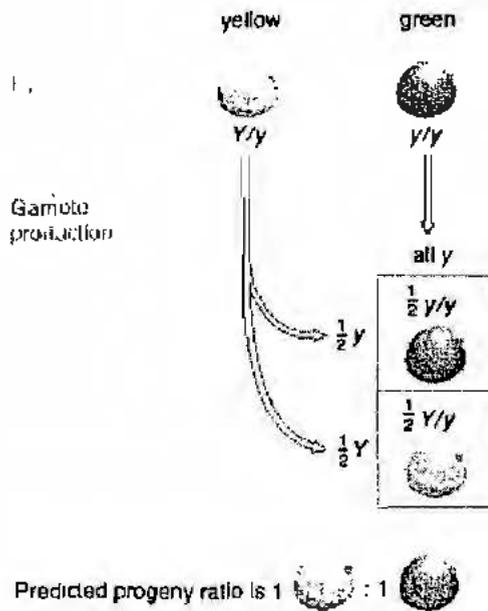
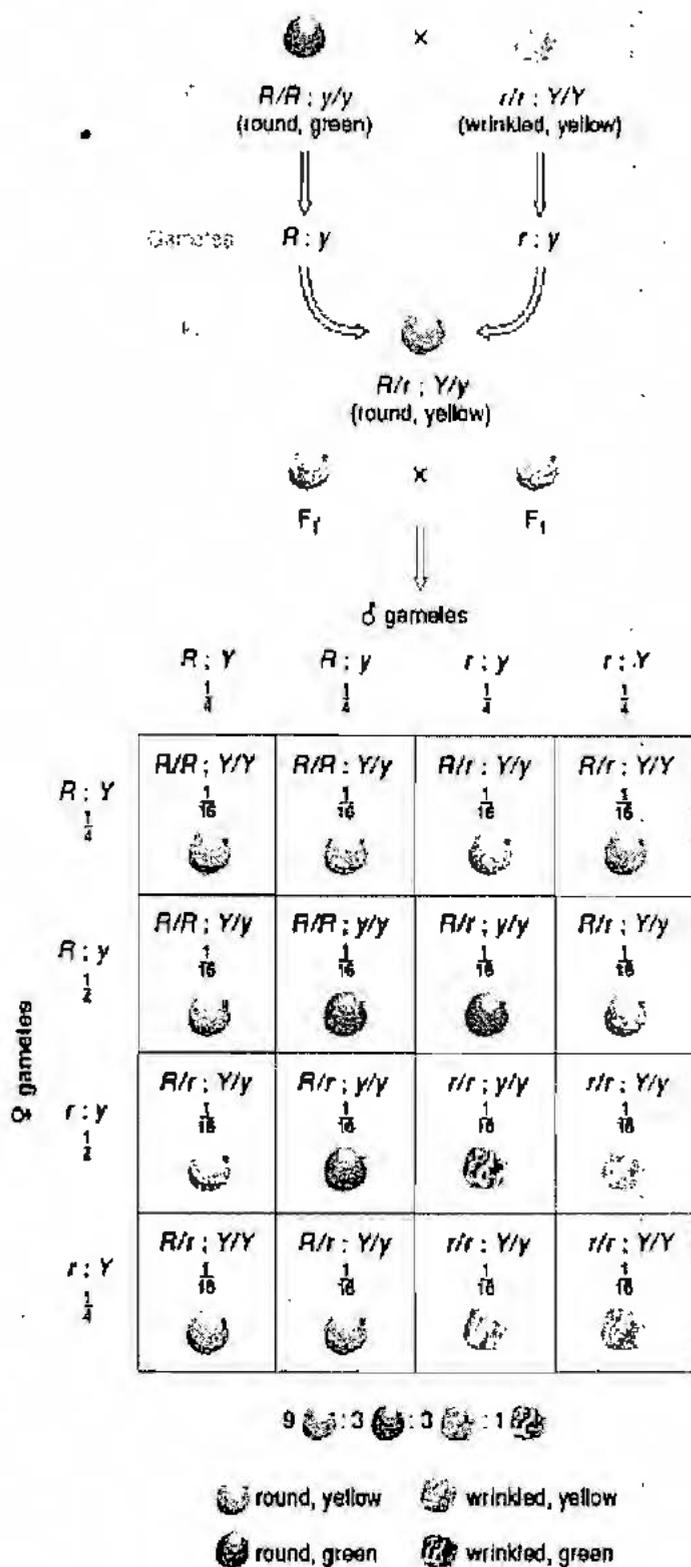


Figura 5.- Cruzamiento de prueba entre plantas de semillas amarillas de la F_1 y plantas de semillas verdes. Y = amarillo; y = verde.

Una vez concluida la serie de experimentos de monohibridismo, Mendel realizó experimentos en los que siguió el comportamiento de dos caracteres distintos a lo largo de las generaciones: **cruzamientos de dihibridismo**.

Los procedimientos que utilizó fueron los mismos que había empleado para los cruzamientos de monohibridismo. Cruzó líneas puras entre sí, esta vez diferentes para dos características; obtuvo la F_1 , que esta vez también fue toda de un mismo tipo e igual a uno de los padres; al cruzar la F_1 entre sí obtuvo la F_2 , que resultó estar formada por cuatro clases de individuos en las proporciones de 9: 3: 3: 1 (Figura 6).



R = Lisas; r = rugosas;
 Y = Amarillas; y = verdes.

Figura 6.- Dihybridismo: resultados de un cruzamiento entre una planta de semillas lisas verdes y una de semillas rugosas amarillas, que en la F₂ da la proporción de 9 lisas amarillas, 3 lisas verdes, 3 rugosas amarillas y 1 rugosa verde.

2.- BASES MOLECULARES DE LAS RELACIONES ENTRE ALELOS

El estudio de los genes a nivel molecular indica que las relaciones entre los alelos pueden ser de varios tipos, entre ellos: a) de dominancia - recesividad, b) de dominancia incompleta y c) de codominancia.

a) Relación de dominancia – recesividad.- Esta fue la relación encontrada por Mendel para los factores determinantes de los siete caracteres de la arveja de jardín estudiados. En términos moleculares esta relación se produce porque el fenotipo que se observa es producto sólo de la transcripción del alelo dominante. El alelo llamado recesivo, como efecto de la mutación que lo originó, no transcribe o bien transcribe un producto génico que no es funcional.

Actualmente se conoce la forma de acción del gen que determina el fenotipo textura de la semilla (lisa-rugosa), estudiado por Mendel. La diferencia clave entre semillas lisas y rugosas está en las cantidades relativas de sucrosa y almidón que ellas contienen. Las semillas lisas tienen un contenido relativamente bajo de sucrosa, ya que convierten buena parte de esta molécula en almidón, como consecuencia absorben poca agua durante su desarrollo y cuando maduran no se deshidratan, permaneciendo lisas. Las semillas rugosas, en cambio, tienen un contenido relativo de sucrosa mayor que las lisas, absorben mayor cantidad de agua durante el desarrollo y cuando maduran se deshidratan, volviéndose rugosas (Figura 7).

Los contenidos relativos de sucrosa y almidón dependen principalmente de la actividad de una enzima, codificada por un gen, que permite la ramificación del almidón a partir de sucrosa. Las semillas rugosas no tienen esta enzima porque tienen sólo la versión mutada del gen (r) que la codifica (genotipo rr). Las semillas lisas poseen el gen R normal y producen la enzima (Figura 7). En los individuos heterocigotos (Rr), el alelo R dirige la síntesis de la enzima en cantidades suficientes como para reducir los niveles de sucrosa y las semillas tienen aspecto liso. **Por lo tanto, R se comporta como dominante sobre r .**

Investigaciones de la década de los 90' mostraron que la mutación se produce por la inserción de un segmento de DNA de origen viral al interior del gen R , que al cambiar el marco de lectura de este gen origina un polipéptido sin actividad enzimática.

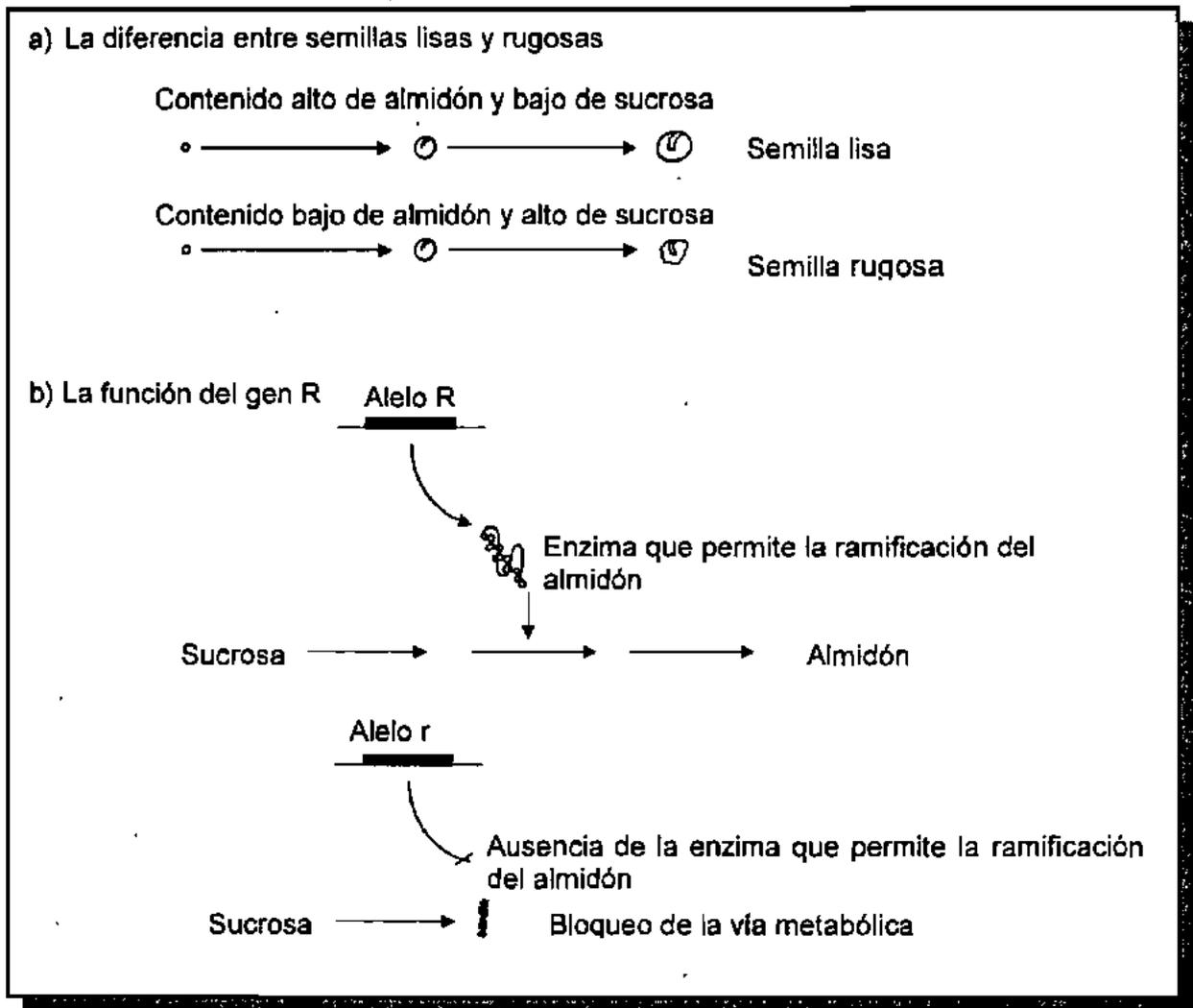


Figura 7.- Bases moleculares de la relación de dominancia-recesividad entre los alelos (R - r) que determinan la textura de las semillas en las arvejas de jardín. (Modificado de Brown TA, "GENETICS a molecular approach", Chapman and Hall, London , UK, 1989).

b) Relación de dominancia incompleta.- En este caso el heterocigoto presenta un fenotipo intermedio al de ambas formas homocigotas. El color de las flores en los claveles es un ejemplo de este tipo de relación, donde siendo RR rojo y rr blanco, el heterocigoto Rr es rosado. Una explicación para este caso, es que la forma heterocigota aunque posee un gen funcional para la síntesis de pigmento rojo, produce sólo cantidades limitadas de la enzima involucrada en la síntesis de éste pigmento y, por lo tanto, las flores serán rosadas (Figuras 8 y 9). Si los pétalos de las flores rosadas se examinan a la lupa se puede ver que están formados por sectores rojos y blancos entremezclados.

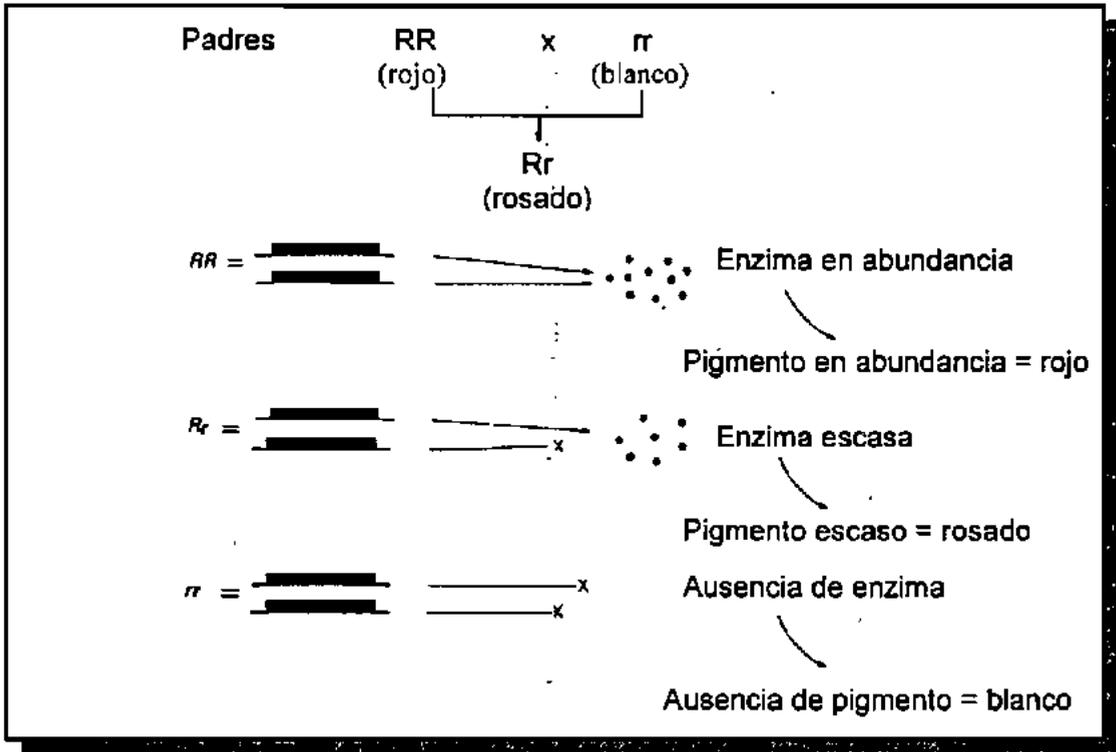


Figura 8.- Bases moleculares de la relación de dominancia incompleta entre los alelos (R - r) que determinan el color de las flores en los claveles.
 (Modificado de Brown TA, "GENETICS a molecular approach", Chapman and Hall, London, UK, 1989).

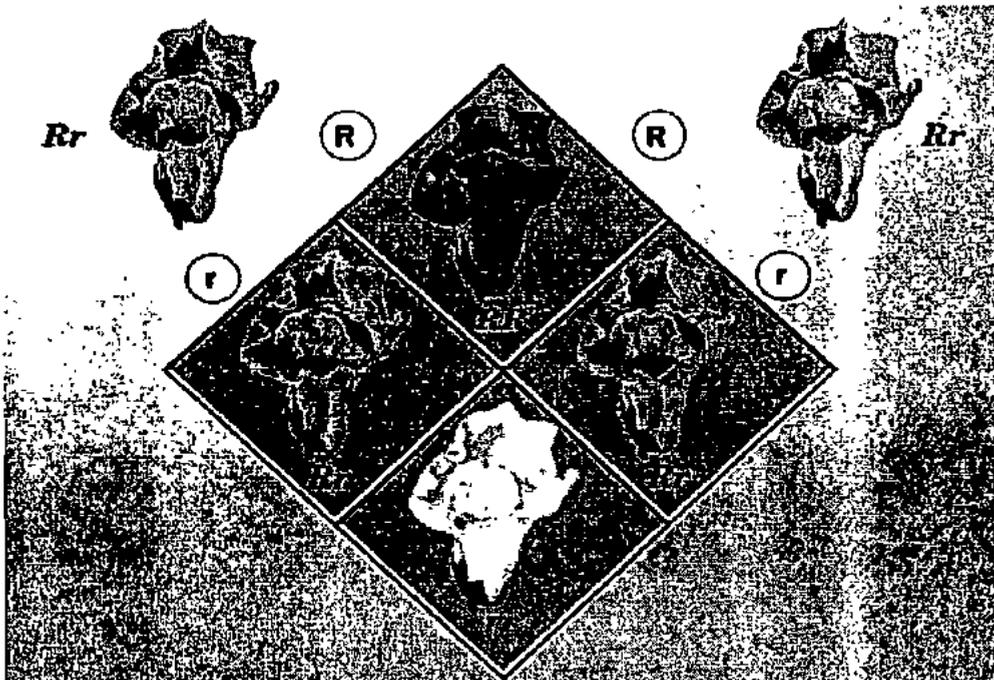


Figura 9.- La generación F₂ de un cruzamiento de flores en que el color de los pétalos está determinado por un par de alelos que presenta una relación de dominancia incompleta.

c) **Relación de codominancia.**- En este caso ambos alelos están activos en el heterocigoto. Un ejemplo conocido de codominancia es el del grupo sanguíneo MN humano, en el que los alelos L^M y L^N codifican para dos formas de antígenos de la membrana de los glóbulos rojos (M y N). Los homocigotos $L^M L^M$ producen sólo antígenos M y tienen el grupo sanguíneo M; los homocigotos $L^N L^N$ producen sólo antígenos N y poseen el grupo sanguíneo N. En los heterocigotos en que los dos alelos están presentes ($L^M L^N$) se producen ambos antígenos en cantidades iguales y el grupo sanguíneo es MN (Figura 10).

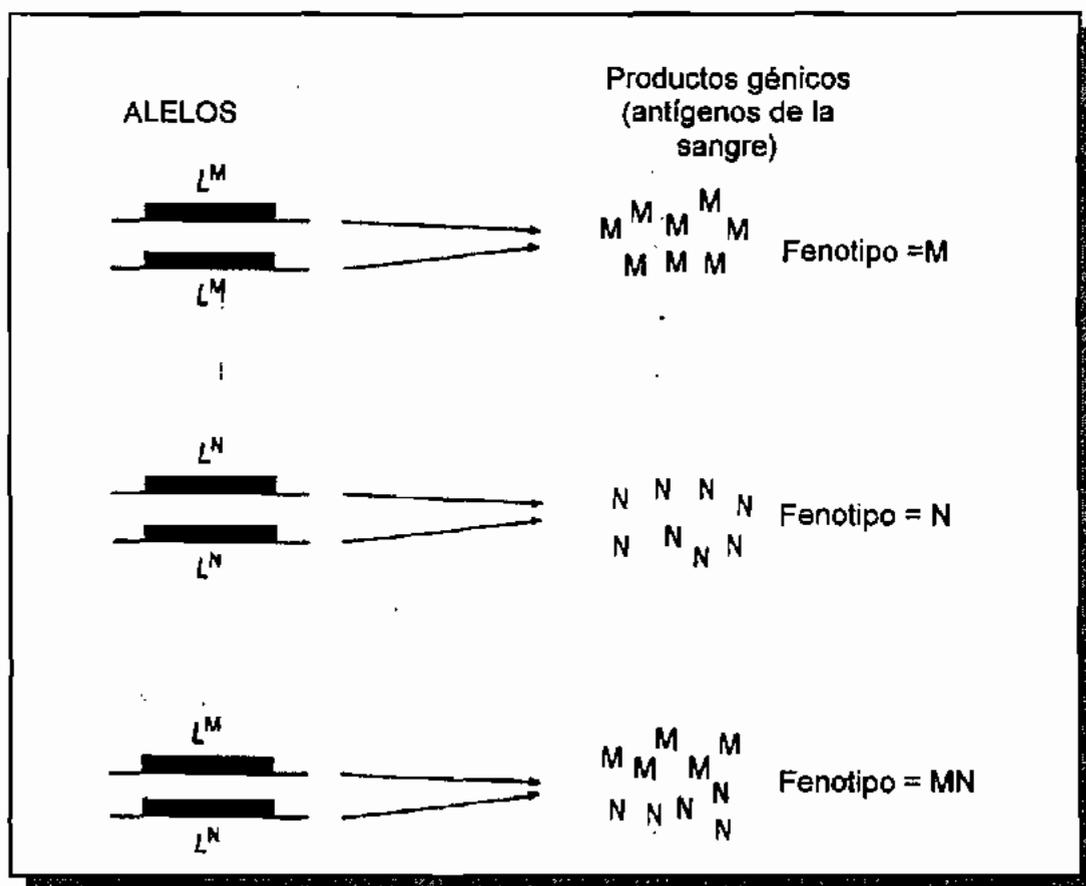


Figura 10.- Bases moleculares de la relación de codominancia entre los alelos ($L^M - L^N$) que determinan el grupo sanguíneo MN en el hombre. (Modificado de Brown TA, "GENETICS a molecular approach", Chapman and Hall, London, UK, 1989).

3.- HERENCIA MENDELIANA EN EL HOMBRE

Los principios mendelianos se cumplen también para la transmisión de las distintas características humanas de determinación monogénica. Ilustraremos lo anterior explicando la herencia de una enfermedad que se transmite en forma autosómica dominante y de otra, que lo hace en forma autosómica recesiva recesiva.

ENFERMEDAD DE HUNTINGTON: UN TRANSTORNO MONOGENICO AUTOSOMICO DOMINANTE (Para más detalles ver <http://www.yourgenesyourhealth.org/>)

La enfermedad de Huntington es un desorden neurodegenerativo que se caracteriza por la aparición progresiva de anomalías motoras, cognitivas, conductuales y psiquiátricas. Los trastornos de los movimientos voluntarios e involuntarios aumentan con el desarrollo de la enfermedad hasta incapacitar al paciente. El corea es un síntoma caracterizado por movimientos involuntarios e incontrolables, que aparecen como temblores no repetitivos ni periódicos y que está presente en más del 90% de los pacientes. Las anomalías cognitivas afectan a todas las funciones del conocimiento y las anomalías conductuales incluyen la desinhibición social, agresión, apatía y desviaciones sexuales. Las manifestaciones psiquiátricas incluyen cambios de personalidad, psicosis y esquizofrenia.

Los individuos que llevan el gen, generalmente, no manifiestan la enfermedad hasta los 35 a 44 años de edad (Figura 10), la media de supervivencia después del diagnóstico es de 15 a 18 años y la muerte ocurre, en promedio, a los 54 a 55 años de vida.

BASES GENÉTICAS

La enfermedad es causada por una mutación de efecto dominante en el gen *HD* (Huntington Disease), que se localiza en el brazo corto del cromosoma 4 y que codifica para una proteína llamada hungtintina, cuya función es aún desconocida. La mutación consiste en la amplificación, al interior del exón 1 del gen, del triplete CAG que codifica para glutamina. Los alelos normales del gen *HD* tienen 10 a 26 repeticiones de CAG, en cambio el alelo mutado tiene más de 36 repeticiones. Existe un estado, denominado de premutación, en que el número de repeticiones de CAG es de 27 a 35 y los individuos presentan fenotipo normal, pero el número de repeticiones ya se ha desestabilizado y tiende al aumento, originándose descendientes que desarrollarán la enfermedad.

Los mecanismos por los cuales la expresión de este segmento poliglutamínico desencadena la enfermedad, no están claros aún, aunque se cree que la expansión de las glutaminas confiere por sí sola un efecto deletéreo. Algunos fenotipos directamente asociados con la mutación son la disfunción y la muerte de las neuronas, aparentemente causadas por la acumulación de agregados intranucleares derivados de la hungtintina mutada.

RIESGO DE TRANSMISIÓN

Cada hijo de un enfermo de *HD* tiene un 50% de riesgo de heredar el alelo mutado. Todos los hijos que hereden ese alelo desarrollarán la enfermedad, siempre que tengan un tiempo de vida que esté dentro de los rangos normales. Los descendientes de individuos que llevan la premutación tienen un riesgo empírico de, aproximadamente, un 3% de heredar un alelo *HD* en el cual la premutación se ha expandido hasta convertirse en una mutación completa.

Si bien no existen más que tratamientos paliativos de los síntomas de la *HD*, se dispone de tests presintomáticos y prenatales, que determinan el número de repeticiones CAG al interior del exón 1 del gen *HD*.

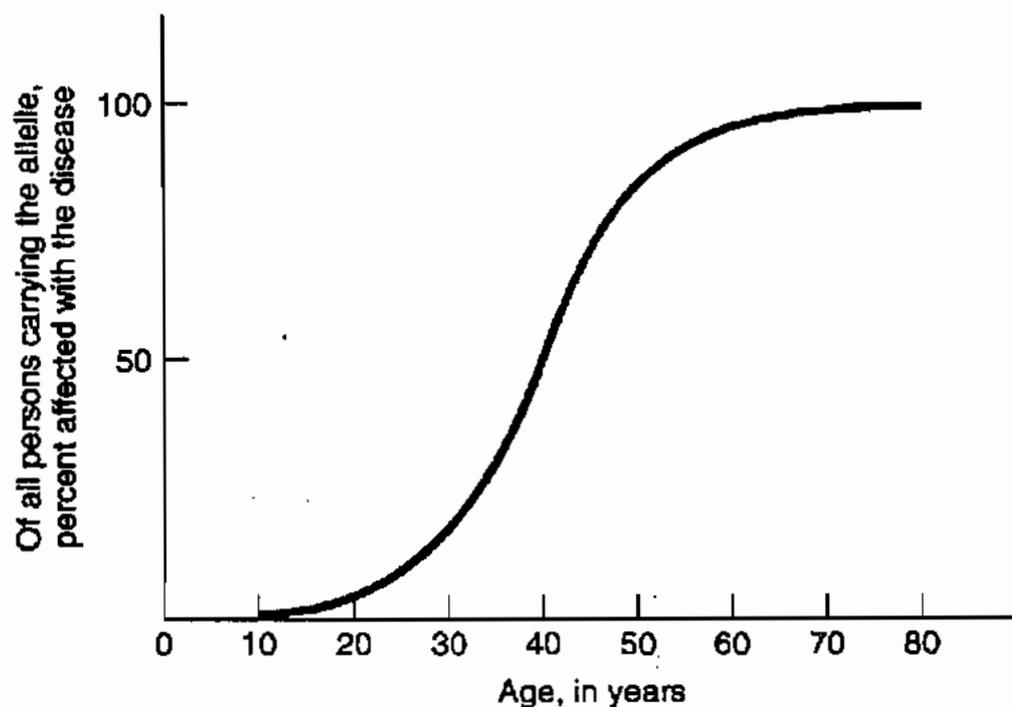


Figura 11.- Edad de aparición de la enfermedad de Huntington. Los individuos que llevan el alelo mutado generalmente no presentan la enfermedad hasta aproximadamente los 35 a 44 años de edad.

FIBROSIS QUÍSTICA: UN TRANSTORNO MONOGÉNICO AUTOSÓMICO RECESIVO

(Para más detalles ver <http://www.yourgenesyourhealth.org/>)

La fibrosis quística es una enfermedad producida por alteraciones en el transporte de iones de cloro a través de las membranas de las células epiteliales de diferentes órganos. La consecuencia inmediata de esta alteración es un cambio en la constitución y densidad de las secreciones a ser transportadas. El síntoma más importante y frecuente es la secreción de grandes cantidades de mucus denso en los pulmones de los pacientes. Este mucus provee de un medio adecuado para el crecimiento de organismos patógenos y obstruye la normal circulación de aire. La ocurrencia de ciclos recurrentes de infección, inflamación y destrucción del tejido del pulmón, disminuyen la cantidad de tejido pulmonar funcional, conducen a fracaso respiratorio y a la muerte. Esta disfunción puede alterar también la secreción normal de otros órganos y sistemas, como el páncreas, sistema biliar, sistema reproductor masculino, glándulas sudoríparas e intestino.

BASES GENÉTICAS

La enfermedad es causada por una mutación del gen que codifica para una proteína involucrada en el transporte de iones de cloro a través de las membranas celulares. Específicamente la mutación consiste en la pérdida o delección de un triplete de nucleótidos, de los 6.100 nucleótidos que componen el gen, el que codifica para fenilalanina. El gen mutado se comporta como recesivo, es decir, debe estar al estado homocigoto para que la enfermedad se presente. Tiene expresividad variable, es decir, individuos de un mismo genotipo pueden presentar sintomatologías distintas en cuanto a la gravedad de la enfermedad y a los órganos comprometidos. El gen se caracteriza además por tener expresión tejido-específica, ya que sólo se manifiesta en determinados tejidos y tipos celulares. Se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 y actualmente se conoce la secuencia completa de los nucleótidos que lo forman.

RIESGO DE TRANSMISIÓN

El riesgo empírico para una pareja de tener un hijo afectado de fibrosis quística, es muy variable y depende de la frecuencia que la enfermedad tenga en el grupo étnico al que la pareja pertenece. La incidencia de nacidos vivos con fibrosis quística varía entre 1 en 113 entre los Hutterites de Alberta, en Canadá, hasta 1 en 90.000 entre las poblaciones de origen asiático de Hawai. En Chile no existen aún estudios epidemiológicos específicos. Se estima que dada la mezcla de caucásicos y amerindios que dio origen a la población chilena, la incidencia de la enfermedad sería de 2.6 en 10.000 habitantes.

Para una pareja de ciudadanos de Estados Unidos, que no tenga antecedentes familiares de la enfermedad y cuyos antecesores provengan del norte de Europa, se estima que el riesgo empírico de que ambos sean portadores del gen es de 1 en 25 y el de tener un hijo afectado es de 1 en 2.500.

Actualmente no existe un tratamiento curativo de la enfermedad, aunque el manejo adecuado de sus síntomas ha aumentado las expectativas de vida de los enfermos, los que pueden llegar a los 30 a 40 años de edad. El diagnóstico prenatal de esta patología requiere de la identificación del gen responsable en el DNA de tejidos fetales.

4.- GENOTIPO, FENOTIPO Y AMBIENTE

En 1909 Wilhelm Johansen (1857-1927) hizo las distinciones entre los conceptos de fenotipo y genotipo. El **fenotipo** de un organismo es su apariencia, es decir lo que de él podemos observar: su morfología macroscópica y microscópica, su fisiología, propiedades bioquímicas y comportamiento, entre otras características. El **genotipo** de un organismo es la constitución genética que ha heredado. Durante la vida de un individuo, el genotipo permanece constante; el fenotipo, en cambio, va cambiando a lo largo de la ontogenia. Esto porque distintos conjuntos de genes se activan y desactivan y además interactúan con distintos ambientes a lo largo del tiempo, originando los diferentes fenotipos que un individuo tiene desde que nace hasta que muere.

La relación entre la presencia de un genotipo específico y un determinado fenotipo no es siempre la misma. Esto es así porque el fenotipo resulta de complejas interacciones entre diferentes genes y entre los genes y el medio ambiente (Figura 12).

Los organismos que se generan mediante reproducción asexual, son genéticamente idénticos entre sí y con sus progenitores, a menos que experimenten mutaciones. En cambio, los organismos que se reproducen sexualmente tienen siempre genotipos diferentes, exceptuando el caso de los gemelos verdaderos o monocigóticos, los que se desarrollan a partir de un solo óvulo fecundado por un único espermatozoide. Estos individuos genéticamente iguales pueden, sin embargo, tener fenotipos distintos debido a la ocurrencia de interacciones diferentes con el medio ambiente. Así, los gemelos monocigóticos pueden ser distintos en estatura, peso y longevidad, entre otros rasgos, debido a la ocurrencia de diferentes experiencias vitales.

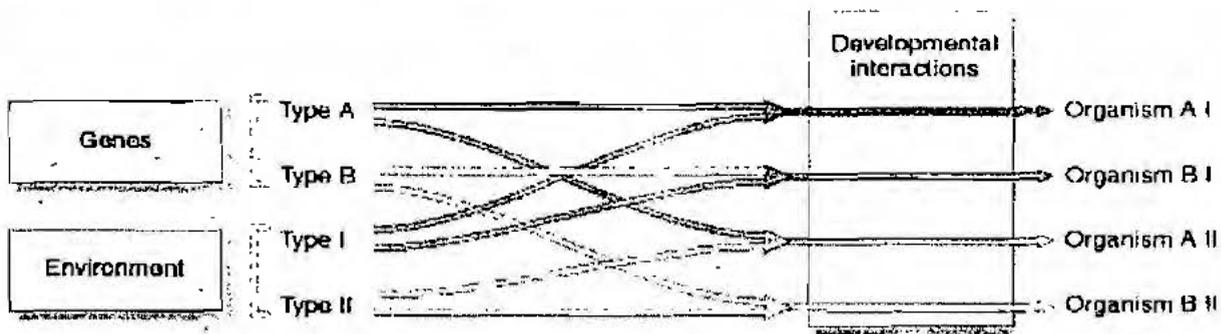


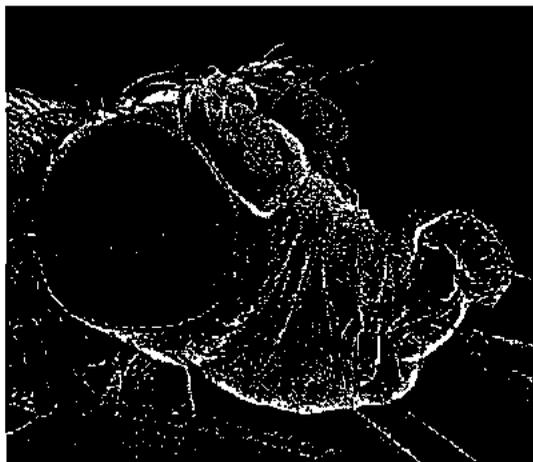
Figura 12.- Interacciones posibles entre distintos genotipos (Tipos A y B) y ambientes (Tipos I y II) que dan como resultado diferentes fenotipos (Organismos AI, BI, AII y BII).

Por lo tanto, el genotipo de un organismo no especifica de forma inalterable su fenotipo. El genotipo determina más bien la serie de fenotipos que pueden desarrollarse en las distintas interacciones con el ambiente y con el resto del genotipo. Esto se conoce como amplitud de reacción o **norma de reacción del genotipo**. El fenotipo que se manifiesta depende principalmente del ambiente en el que tiene lugar el desarrollo. Por esta razón toda la norma de reacción de un genotipo no se conoce nunca, porque esto requeriría que los individuos con un determinado genotipo fueran expuestos a todos los ambientes posibles, los que son virtualmente infinitos. En la práctica sólo podemos establecer las relaciones entre un genotipo parcial, un fenotipo parcial y algunos aspectos particulares del ambiente.

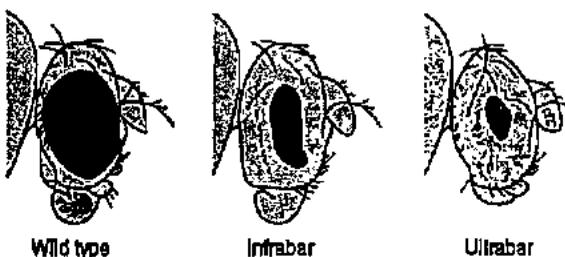
Un ejemplo que ilustra bien el concepto de norma de reacción del genotipo es el que se ha establecido para tres genotipos que determinan tamaño del ojo en *Drosophila melanogaster*. Las moscas silvestres, que como todos los dípteros tienen ojos facetados, poseen un ojo que tiene entre 800 a 1000 facetas, lo

que origina un ojo de un tamaño determinado (Figura 13a). Una mutación génica, que consiste en una duplicación del sector 16A del cromosoma X, tiene como efecto la producción de un ojo de menor tamaño, compuesto por 170 a 280 facetas, denominado infrabar. Si esta misma mutación está triplicada, se produce un ojo de tamaño aún menor, compuesto por 65 a 170 facetas, denominado ultrabar (Figura 13b).

Si las moscas son criadas en ambientes con distintas temperaturas, entre 15° C y 30° C, se producen variaciones en el número de facetas de los ojos para individuos de un mismo genotipo, mostrando la norma de reacción a la temperatura de estos tres genotipos (Figura 13c). De la observación del gráfico se desprende que: a) cada genotipo presenta diversos fenotipos según la temperatura a la que se produzca el desarrollo; b) en las moscas de genotipo silvestre y ultrabar el número de facetas disminuye con el aumento de temperatura, en cambio, en las moscas de genotipo infrabar el número de facetas aumenta con el aumento de temperatura; c) no existe una relación unívoca entre genotipo y fenotipo. Así, el saber que una mosca tiene genotipo silvestre no nos informa respecto a si tendrá 800 o 1000 facetas, por otra parte el saber que una mosca tiene ojos con 170 facetas no nos informa respecto a si su genotipo es infrabar o ultrabar; d) el genotipo silvestre produce fenotipos distinguibles de los otros dos, en cambio, los genotipos infrabar y ultrabar dan fenotipos que se superponen parcialmente (Figura 13c).



(a)

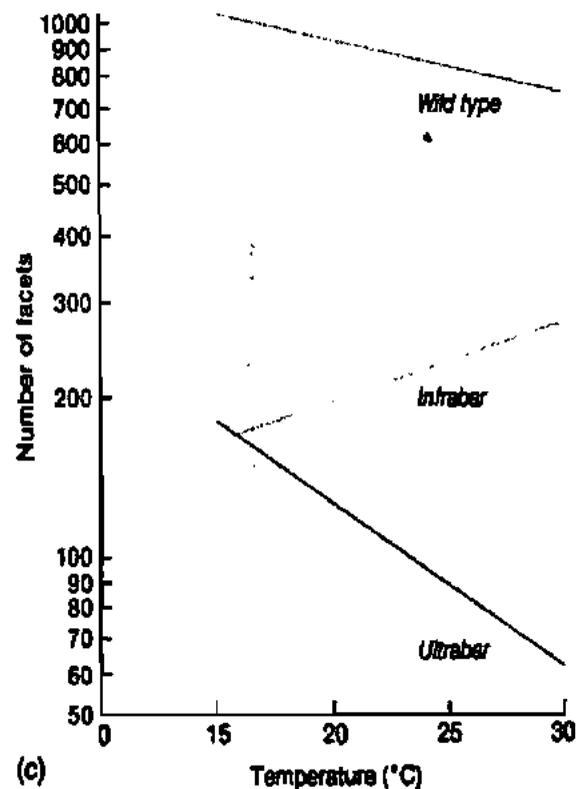


Wild type

Infrabar

Ultrabar

(b)



(c)

Figura 13.- Normas de reacción a la temperatura para tres genotipos diferentes que determinan el tamaño del ojo en *Drosophila*. a) Ojo normal de la mosca, mostrando los cientos de facetas que lo forman; b) Tamaño relativo del ojo, según el número de facetas, en moscas de genotipos silvestre, infrabar y ultrabar; c) Gráfico que ilustra las normas de reacción a la temperatura de los tres genotipos mostrados en b.

Algunos genotipos expresan poca o ninguna variación en los distintos ambientes en los que deben expresarse. En estos casos el análisis genético es más fácil, ya que los fenotipos observados constituyen una expresión inambigua de los respectivos genotipos. Este es el caso de los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO y también, de los siete caracteres de la arveja de jardín utilizados por Mendel. **¡¡¡Si no hubiera sido así probablemente Mendel no habría llegado a las conclusiones que llegó y no habría podido formular los principios que formuló!!!**

V.- PREGUNTAS ORIENTADORAS:

- 1) Defina brevemente los siguientes términos: genes alelos, locus (loci), homocigoto, heterocigoto, gen dominante, gen recesivo, genes codominantes, genotipo, fenotipo, monohibridismo, dihibridismo, cruzamiento de prueba.
- 2) Enuncie el primer y segundo principio mendeliano. Señale las base citológicas que permiten que estos principios se cumplan y compare la universalidad de ellos.
- 3) ¿Qué se entiende por norma de reacción de un genotipo? Ilustre con un ejemplo distinto al desarrollado en esta Sesión.
- 4) Una mujer es heterocigota para dos pares de genes. ¿Cuántas clases distintas de gametos puede producir y en qué proporciones?
- 5) Suponga que esta mujer tiene hijos con un varón cuyo genotipo es Aabb. ¿Cuáles son las proporciones fenotípicas y genotípicas esperadas en la descendencia?
- 6) La anemia de células falciformes (ACF) es una enfermedad hereditaria humano causada por un alelo recesivo. Una pareja piensa casarse y quieren conocer la probabilidad de tener un hijo afectado, ¿qué información habría que proporcionarles si: a) ambos fueran normales, pero cada uno de ellos tuviera un padre afectado y el otro progenitor sin historia familiar de ACF; b) si el varón estuviera afectado por la enfermedad, pero la mujer no tuviera historia familiar de ACF?

APENDICE A UTILIZAR EN LAS CLASES DE GENÉTICA FORMAL

I.- OBJETIVO GENERAL :

Conocer y comprender los principios y mecanismos de transmisión y distribución del material genético, así como, las causas biológicas, genéticas y ambientales de la variación.

II.- CONTENIDOS PRINCIPALES:

El interés que despiertan en nosotros la genética y la transmisión de los caracteres hereditarios se remonta a las culturas prehistóricas de hace más de 10.000 años atrás, aunque probablemente surgió antes que ellas. El cultivo de las plantas y la domesticación de los animales fueron eventos que necesariamente debieron ocurrir para que las sociedades humanas dejaran de recoger frutos y de cazar animales y pudieran dedicarse a la agricultura y al pastoreo. Existen vestigios zoológicos y representaciones pictóricas que indican que hace unos 10.000 a 12.000 años, el hombre domesticaba perros, ovejas, cabras, bueyes, camellos y otros animales.

Una vez que los animales fueron domesticados, los rasgos heredables pudieron reconocerse y utilizarse, mediante apareamientos selectivos, para obtener reservas de animales con caracteres adecuados a las necesidades humanas. Aunque estos procesos de domesticación y selección se desarrollaron, probablemente de un modo lento, la manipulación genética de los animales y de las plantas evolucionó al mismo tiempo que otras muchas conquistas de la sociedad humana y cimentaron su prosperidad material. Los antiguos poetas relatan, por ejemplo, que parte de la riqueza y de la fama de la antigua Troya se debió a la pericia de sus habitantes en la cría de caballos.

En los años inmediatamente posteriores a la publicación por Darwin de su libro *El origen de las especies*, la labor de un monje agustino llamado **Gregorio Mendel** hizo que cambiaran espectacularmente las ideas sobre la herencia, las que nadie había discutido durante miles de años. Cultivando arvejas de jardín, Mendel demostró que los rasgos se transmiten desde los padres a la descendencia gracias a la herencia de unos **factores** que ahora conocemos como **genes**. Mendel dedujo que cada uno de los padres debe aportar un factor para que aparezca un rasgo observable en la descendencia y que los miembros de estas parejas de factores se separan unos de otros durante la formación del óvulo y del espermatozoide.

La importancia del trabajo de Mendel no fue reconocida hasta 1900. El término **Genética**, acuñado por William Bateson en 1906, deriva del griego *genesis* (origen) y define a la ciencia que se dedica al estudio de la herencia y de la expresión de los caracteres hereditarios. La **Genética**, como disciplina organizada, se inició en el siglo XX y ha avanzado hasta tal punto que hemos sido capaces de trasladar genes humanos a los animales y de sustituir genes humanos defectuosos por genes normales. Aunque, en general, el progreso de la Genética ha sido rápido en este siglo, los avances en **genética humana** han sido irregulares y, en ocasiones, ha sido mal utilizada con fines sociales y políticos.

En esta Unidad del Curso nos proponemos darles a conocer los conceptos básicos de la genética, los principales hitos históricos que posibilitaron su avance y crecimiento y el estado actual de la disciplina, principalmente en aquellas materias relacionadas con la genética humana o que tienen aplicación directa en el hombre.

III.- RESOLUCIÓN DE PREGUNTAS Y PROBLEMAS DE GENÉTICA:

La Genética es una disciplina fascinante, pero su aprendizaje resulta difícil para muchos estudiantes. En esto se parece a la Física, ya que ambas son ciencias matematizadas y deductivas. La resolución de preguntas y problemas de Genética requiere, entonces, de una lectura muy cuidadosa de los

enunciados, ya que la información muchas veces está escondida en el planteamiento, o debe ser deducida, traducida o simplemente ordenada, a partir de lo que ya se sabe.

Por otra parte, los problemas de Genética frecuentemente necesitan traducirse o expresarse en forma de **probabilidades**. Para hacer esto considere las siguientes definiciones y reglas de cálculo.

Probabilidad: es el número de veces que un evento ocurre, dividido por el número total de oportunidades en que ese evento podría haber ocurrido.

Reglas que rigen las probabilidades:

a) Regla de la afirmación "y" (incluyente): la probabilidad de que dos eventos INDEPENDIENTES ocurran simultáneamente es igual al producto de sus respectivas probabilidades.

b) Regla de la afirmación "o" (excluyente): cuando dos eventos independientes son MUTUAMENTE EXCLUYENTES, la probabilidad de que ocurra cualquiera de ellos es igual a la suma de sus respectivas probabilidades.

Material Complementario

Clase

Martes 17 de Enero de 2006

“MECANISMOS DE VARIABILIDAD GENÉTICA”

Profesora: LAURA WALKER B.

MECANISMOS DE VARIABILIDAD GENÉTICA.

PROFESOR: LAURA WALKER B.

I.- OBJETIVOS:

- Comprender que la mutación génica es el proceso por el cual los genes cambian de una forma alélica a otra, originando variabilidad genética.
- Conocer que las mutaciones cromosómicas pueden alterar la estructura o el número de cromosomas de una célula.
- Comprender que las mutaciones cromosómicas tienen efectos fenotípicos severos, tales como, aborto, retardo mental, malformaciones, etc., porque implican alteraciones de número o posición de bloques de genes.
- Conocer la frecuencia de mutaciones génicas y cromosómicas en el hombre, y evaluar algunas de sus causas y consecuencias, a través del análisis de ejemplos concretos.

II.- CONTENIDOS PRINCIPALES:

- Concepto de mutación génica. Mutaciones génicas somáticas y germinales. Orígenes y consecuencias (mutaciones erróneas, silentes y sin sentido).
- Mutaciones espontáneas e inducidas.
- Tipos de mutaciones génicas.
- Mutaciones cromosómicas estructurales: orígenes y consecuencias fenotípicas, ejemplos en el hombre.
- Mutaciones cromosómicas de número: orígenes y consecuencias fenotípicas, ejemplos en el hombre.
- Las mutaciones cromosómicas como causa importante de abortos espontáneos.

III.- BIBLIOGRAFÍA:

- Ayala FJ y Kiger J. 1984. Genética Moderna. Fondo Educativo Interamericano.
- Pincheira J. 1993. "Daño, reparación y mutación del material genético". En Elementos de Biología Celular y Genética, eds. AE Spotorno y G Hoecker. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- Thompson MW, McInnes RR y Willard HF. 1996. En: Thompson & Thompson: Genética en Medicina. Masson S.A. Cuarta Edición.
- Walker LI. 1993. "Citogenética general: cromosomas y cariotipos". En Elementos de Biología Celular y Genética, eds. AE Spotorno y G Hoecker. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- Walker LI y Tapia G. 1998. "Mutaciones génicas y cromosómicas". En Problemas de Genética, ed. LI Walker, Editorial Universitaria.

NOTA: Las imágenes de esta Sesión fueron tomadas de la versión en la red de Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC., Gelbart WM. 2000. "An Introduction to GENETIC ANALYSIS", Seventh Edition, WH Freeman and Company, New York, USA.

IV.- DESARROLLO:

La propiedad de un gen de transmitirse a la descendencia se basa en la propiedad del DNA de replicar correctamente, generando moléculas hijas idénticas a la molécula parental. Sin embargo, esto muchas veces no ocurre así, debido a que durante la replicación se agregan nucleótidos en forma incorrecta a la molécula de DNA en formación. Si estos errores no son reparados durante los períodos S o G₂ del ciclo celular, se producirán apareamientos equivocados de bases nucleotídicas, los que en la replicación celular siguiente se traducirán en alteraciones de la secuencia de bases que modificarán el mensaje original del DNA. Si estas alteraciones o **mutaciones** ocurren en células de la línea germinal (**mutaciones germinales**), se transmitirán a la descendencia y podrán difundirse en la población, si ellas ocurren en células somáticas, sólo afectarán al individuo en que se producen (**mutaciones somáticas**).

La capacidad del DNA de mutar y de transmitir estos cambios a lo largo del tiempo, constituye la **fuerza primaria de variabilidad genética** de una especie. La **mutación** puede definirse como el cambio en el material hereditario producto de un daño mal o no reparado, que se propaga a través de las generaciones sucesivas, tanto en células aisladas como en organismos completos. Una mutación puede afectar a un solo locus y en este caso se la denomina **mutación génica**, o bien, puede afectar a la estructura o el número de cromosomas, comprometiendo a muchos loci, y en este caso se la denomina **mutación cromosómica**.

Por otra parte, según sea la causa que produce el cambio, las mutaciones pueden producirse espontáneamente (**mutaciones espontáneas**), o bien ser inducidas (**mutaciones inducidas**), por diversos agentes físicos o químicos.

1.- **MUTACIONES GÉNICAS**

El mecanismo básico que origina mutaciones génicas es la ocurrencia de cambios en la secuencia de nucleótidos del DNA.

Las mutaciones génicas que ocurren en forma espontánea, lo hacen a tasas relativamente bajas (Tabla 1), en cambio, las que ocurren en forma inducida por la acción de agentes físicos o químicos, lo hacen a tasas significativamente más elevadas. El estudio de algunos genes humanos que mutan espontáneamente, indicó que las frecuencias de mutación oscilan entre que 1×10^{-4} a 1×10^{-6} por un millón de gametos producidos (Tabla 1).

Tabla 1.- Frecuencia de algunas mutaciones génicas en el hombre.

Rasgos	Mutantes / millón de gametos	Frecuencia de la mutación
Acondroplasia	10	1×10^{-5}
Aniridia	2.6	2.6×10^{-6}
Retinoblastoma	6	6×10^{-6}
Osteogénesis imperfecta	10	1×10^{-5}
Neurofibromatosis	50 -100	$0.51 -1 \times 10^{-4}$
Enfermedad poliquística renal	60 -120	$6 -12 \times 10^{-4}$
Distrofia muscular de Duchenne	50 -100	$0.5 - 1 \times 10^{-4}$

Se distinguen varios tipos de mutaciones génicas: a) sustituciones, b) duplicaciones y deleciones, c) inserciones y d) repeticiones inestables de trinucleótidos.

a) Sustituciones .- En este caso el cambio consiste en el reemplazo de un nucleótido por otro. Las mutaciones por sustitución pueden ser de dos tipos: de **transición** y de **transversión**. En una mutación de **transición**, una base púrica (adenina o guanina) es reemplazada por otra púrica (A x G, o a la inversa, G x A); o bien una base pirimidica (citosina o timina) es reemplazada por otra pirimidica (C x T o T x C). Por otra parte, en una mutación por **transversión**, una base púrica es reemplazada por una pirimidica, o viceversa. En este caso existen 8 posibilidades distintas de cambios o sustituciones: A x C o bien C x A; A x T o bien T x A; G x C o bien C x G; G x T o bien T x G.

Efecto de las sustituciones.- Como el reemplazo o sustitución de un nucleótido tiene como consecuencia la creación de un nuevo codón, uno de sus efectos puede ser la síntesis de un nuevo aminoácido en la proteína en elaboración. La proteína mutada resultante puede producir alteraciones morfológicas o fisiológicas, que en muchas ocasiones son letales para el individuo que las porta. Las mutaciones que tienen este efecto son llamadas **mutaciones erróneas**. Sin embargo, el hecho que los aminoácidos están, en general, codificados por más de un codón (redundancia del código genético) hace que muchas sustituciones de nucleótidos no tengan efecto fenotípico alguno. Las mutaciones que no tienen efecto fenotípico son llamadas **mutaciones silentes**. Por último, las sustituciones pueden también crear codones de término que suspenden la lectura del mensaje y originan proteínas más cortas que las originales, las que generalmente no son funcionales. Las mutaciones que tienen este efecto son llamadas **mutaciones sin sentido**.

Un ejemplo de una sustitución por transversión que tiene un efecto fenotípico conocido, es el que experimenta el gen que codifica para una de las dos cadenas de la hemoglobina, molécula formada por 146 aminoácidos. En el gen normal, el triplete que codifica para ácido glutámico, aminoácido que ocupa la sexta posición de la molécula de hemoglobina, puede mutar cambiando de CTC a CAC. La sustitución del tipo transversión, experimentada por el segundo nucleótido de este triplete, tiene como consecuencia directa la síntesis de valina a cambio del ácido glutámico, codificado por el gen normal (Figura 1). Además, la hemoglobina ahora sintetizada (hemoglobina S) no es capaz de transportar eficientemente el oxígeno, dando origen a una enfermedad llamada anemia falciforme.

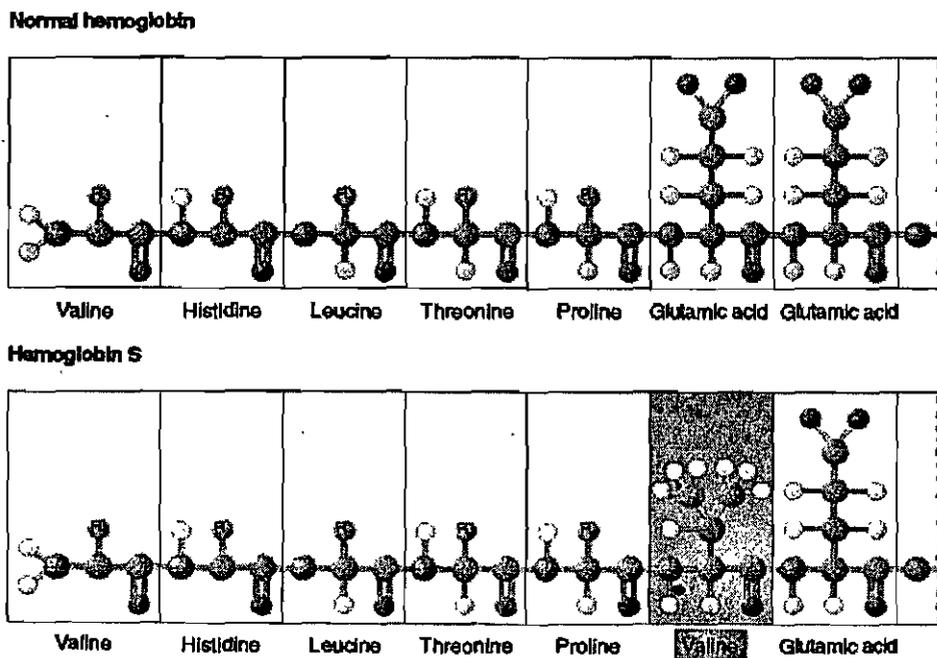


Figura 1.- Diferencia a nivel molecular entre la hemoglobina normal y la hemoglobina S, causante de la anemia falciforme. Se muestran sólo los primeros siete aminoácidos ya que el resto de ellos es igual en ambas moléculas. Nótese que el aminoácido en posición sexta cambia de ácido glutámico, en la hemoglobina normal, a valina en la hemoglobina S.

b) Duplicaciones y deleciones.- En este caso las mutaciones consisten en la duplicación o la pérdida, respectivamente, de uno o más nucleótidos en la molécula de DNA. El efecto principal de este tipo de mutaciones génicas es el cambio del marco de lectura del DNA.

c) Inserciones.- En este caso la mutación consiste en la adición de uno o más nucleótidos en la molécula de DNA. Es frecuente que en el genoma de mamíferos se inserten largos segmentos de DNA de origen viral. La consecuencia principal de este tipo de mutación génica es, al igual que en las duplicaciones y deleciones, el cambio del marco de lectura del DNA.

Cambios del marco de lectura del DNA.- Las mutaciones génicas por duplicación, deleción o inserción de una o más bases, tienen, en general, efectos devastadores en la célula o en el organismo. En estas situaciones, se desplaza el marco de lectura del gen, es decir, la información presente en el DNA se lee de distinta forma a partir del punto de ocurrencia de la mutación. Los cambios de la pauta de lectura del DNA pueden crear dos tipos de problemas. Todos los aminoácidos a partir del punto de ocurrencia de la mutación pueden ser diferentes, generando una proteína no funcional. También pueden producirse alteraciones en el término de la lectura del mensaje. Esto puede ocurrir por generación de un codón de término antes de lo que estaba inicialmente estipulado, lo que determinará la síntesis de una proteína más corta que la normal, la que generalmente no será funcional. Otra posibilidad es que debido al corrimiento de la lectura, el codón que era de término deje de serlo, lo que determinará que la traducción del mensaje continuará más allá del gen, originando también un producto no funcional.

d) Repeticiones inestables de trinucleótidos.- El genoma humano, como otros genomas de mamíferos, se caracteriza por tener una proporción alta de secuencias de DNA repetido que no son codificantes. Se ha encontrado que algunas enfermedades humanas, la mayor parte de ellas de tipo neurológico, se relacionan con la expansión de tripletes de nucleótidos, generalmente ricos en bases guanina y citosina, localizados en algún sector particular del genoma (Tabla 2). Estas repeticiones de trinucleótidos se caracterizan por: i) ser altamente variables en el grado de repetición entre las células de un mismo individuo y entre los individuos de la población; ii) tener un patrón de repetición que no se mantiene constante de célula a célula, sino que experimenta variaciones a lo largo del tiempo; iii) para las enfermedades más conocidas (Tabla 2), se ha encontrado que los individuos normales presentan un rango específico para el número de estas repeticiones, las que se mantienen estables en los procesos de mitosis y meiosis. Por sobre un cierto **umbral del número de repeticiones**, éstas se vuelven inestables, tendiendo rápidamente a amplificarse, de tal manera que los descendientes de estos individuos tienen un número muy elevado de ellas y presentan el fenotipo enfermo; iv) no se conoce con certeza la relación entre la amplificación de estos sectores del genoma y la aparición de cada una de las enfermedades, pero para algunas de ellas está claro, que la expansión de trinucleótidos produce inhibición de la expresión de los genes vecinos, lo que desencadenaría la aparición de la patología.

Tabla 2.- Algunas repeticiones inestables de trinucleótidos en el genoma humano y sus consecuencias.

Enfermedad	Localización del gen	Secuencia repetida	Número de repeticiones		
			Normal	Premutación	Mutación
Corea de Huntington	4 p	(CAG) _n	9-35	?	37 - 100
Ataxia espino-cerebelar	6 p	(CAG) _n	19-36	?	43 - 81
X frágil	X q	(CGG) _n	6-54	50 - 200	200 - >1.000
Distrofia miotónica	19 q	(CTG) _n	5-35	37 - 50	50 - 4.000

? = para algunas enfermedades no se conoce el número de repeticiones de la premutación.

Una de las enfermedades más conocidas relacionadas con las repeticiones inestables de trinucleótidos, se denomina **síndrome del X frágil**. La enfermedad se denomina así porque los individuos que la padecen experimentan roturas en el extremo del brazo largo del cromosoma X, sector donde se localiza el gen mutado, con una frecuencia mayor que los individuos normales. Además la cromatina de ese sector del X tiene un grado de decondensación muy superior al que presenta el resto del cromosoma. Entre los síntomas característicos de los individuos que padecen el síndrome están el presentar retardo mental, patrones de lenguaje alterados, apariencia facial típica (orejas prominentes, cara alargada, frente elevada), y en los varones, testículos de gran tamaño. La frecuencia de la enfermedad es de 1/1.500 en varones y de 1/ 2.500 en mujeres.

El síndrome está asociado con el grado de repeticiones del trinucleótido CGG en sectores no codificantes del gen FMR-1 (Fragil Mental Retardation - 1), localizado en el extremo del brazo largo del X. Los individuos normales presentan 6 a 54 copias estables de este trinucleótido. Existe un número de repeticiones intermedio (50 a 200), conocido como estado de **premutación**, en que el individuo aún no presenta la enfermedad, pero en ellos ese sector del genoma se ha vuelto inestable, tendiendo a la amplificación. Sobre un cierto **umbral de repeticiones** (200) aparece el fenotipo alterado (Tabla 2). Se cree que las modificaciones del número de repeticiones ocurren durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, porque los individuos afectados son mosaicos celulares para el número de repeticiones.

2.- MUTACIONES CROMOSÓMICAS

Son cambios en la estructura o en el número de los cromosomas de una especie, que se producen en forma espontánea a tasa bajas, o inducidas por la acción de drogas, virus o radiaciones, a tasas más elevadas. Son generalmente desventajosas para el individuo que las porta o para sus descendientes, si es que ellas ocurren en las células de la línea germinal. De hecho el 50% de los abortos espontáneos humanos son causados por mutaciones cromosómicas.

Para caracterizarlas es necesario conocer el cariotipo de la especie en análisis. Se entiende por **cariotipo**, la dotación de cromosomas propia de la especie. En la caracterización precisa de un cariotipo ha sido de gran utilidad el desarrollo de las técnicas de bandeado cromosómico. Estas permiten distinguir en un cromosoma, bandas claras y oscuras, formando un patrón que es único para cada cromosoma y es repetible en todas las células de ese individuo y en todos los individuos de la especie. El número de bandas en un cariotipo humano haploide en metafase es, en promedio, de 450, pero si los

cromosomas están en prometafase, es decir más decondensados, el número de bandas distinguibles es, en promedio, superior a 1.200. La modificación de los patrones de bandas cromosómicas, permite actualmente que la ocurrencia de una mutación estructural, es decir la pérdida o duplicación de un sector cromosómico, sea asignada no sólo a un cromosoma específico sino que a una región particular de éste. Con esta metodología, los cromosomas que faltan o están en dosis extra en las mutaciones cromosómicas de número, pueden ser inambiguamente identificados.

2.1.- MUTACIONES CROMOSÓMICAS ESTRUCTURALES

Son mutaciones que producen reordenamientos al interior de los cromosomas, alterando la posición normal de los genes en un grupo de ligamiento.

a) Deleciones y duplicaciones

En estas mutaciones ocurre pérdida o duplicación, respectivamente, de un sector cromosómico. Las duplicaciones suelen no tener efectos fenotípicos graves, las deleciones, en cambio, tienen efectos fenotípicos devastadores.

Una deleción conocida en el hombre es la que afecta al extremo del brazo corto del cromosoma 5 (Figura 2). La ocurrencia de la deleción al estado heterocigoto y, por lo tanto, la pérdida de los genes contenidos en ese sector cromosómico, se traduce en una alta tasa de muerte embrionaria. Los pocos individuos que logran nacer, igualmente mueren al poco tiempo después del nacimiento y presentan un conjunto de anomalías fenotípicas que, en conjunto, configuran el **síndrome de "cri du chat"** o de llanto de gato. El síndrome se ha designado así porque los niños, por presentar anomalías en las cuerdas vocales, tienen un llanto similar al maullido de un gato. Otros fenotipos anómalos asociados y causantes de la muerte, son microencefalia, retardo mental y anomalías graves del corazón y del sistema circulatorio.

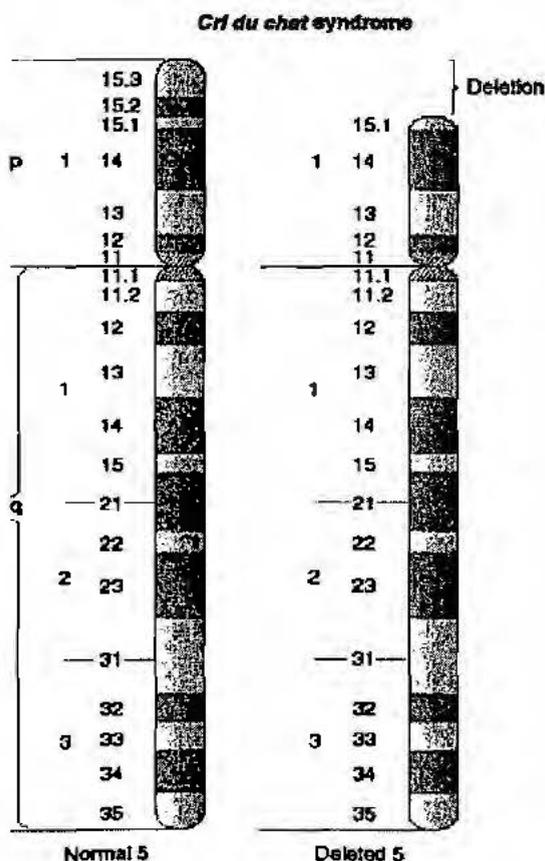


Figura 2.- Representación de los patrones de bandas G del cromosoma 5 humano normal (izquierda) y de uno con una deleción en el extremo de su brazo corto (derecha), la que es responsable del síndrome de "cri du chat".

b) Inversiones

Estos reordenamientos se producen como resultado de la ocurrencia de dos fracturas cromosómicas, seguidas de un giro de 180° del fragmento comprendido entre ellas. Según si el fragmento contiene o no el centrómero, la inversión se denomina **pericéntrica** o **paracéntrica**, respectivamente. Una inversión puede generar nuevos grupos de ligamiento y cambios en la expresión de un gen por efecto de posición.

Otra consecuencia de la ocurrencia de una inversión es la inviabilidad gamética. En un organismo portador de una inversión al estado heterocigoto, el apareamiento punto a punto entre los homólogos durante la meiosis, determina la formación de un "loop" o asa en la zona del segmento invertido (Figura 3). Un resultado interesante de la formación de esta asa, es la baja frecuencia de recombinación para los alelos presentes en la región involucrada. La razón por la cual la recombinación disminuye no es que ocurra supresión del crossing-over, sino que los productos de la recombinación que ocurre dentro del asa, generalmente, se pierden.

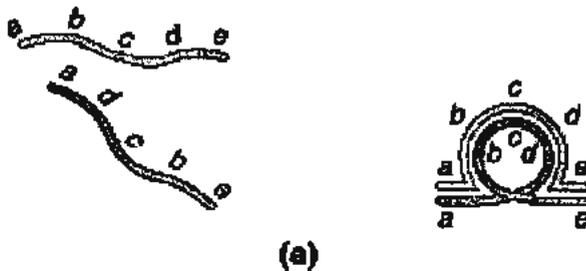


Figura 3.- Inversión cromosómica al estado heterocigoto en un par de cromosomas homólogos (izquierda) y representación de estos mismos cromosomas en la meiosis (derecha).

Si se trata de una **inversión paracéntrica**, en la que el segmento que se invierte no involucra al centrómero, los productos del crossing-over son un cromosoma acéntrico y uno dicéntrico. El fragmento acéntrico no es incorporado en el gameto y el dicéntrico se fractura en algún sector, formando gametos genéticamente desbalanceados por tener duplicaciones y deficiencia de genes (Figura 4). En una **inversión pericéntrica**, en la que el segmento que se invierte involucra al centrómero, las cuatro cromátidas productos de un único crossing-over poseen centrómero y, por lo tanto, quedan incluidas en los gametos. Sin embargo, dos cromátidas presentan desbalance genético, porque tienen duplicaciones y deficiencias génicas (Figura 5), que determinan la inviabilidad de los gametos que las portan. Las inversiones pericéntricas y paracéntricas disminuyen entonces el número de gametos viables y, por lo tanto, determinan la semiesterilidad del individuo que lleva la inversión. Esta disminución de la fertilidad es justamente el efecto principal de las inversiones, ya que los individuos que las portan, generalmente, no presentan otras alteraciones fenotípicas.

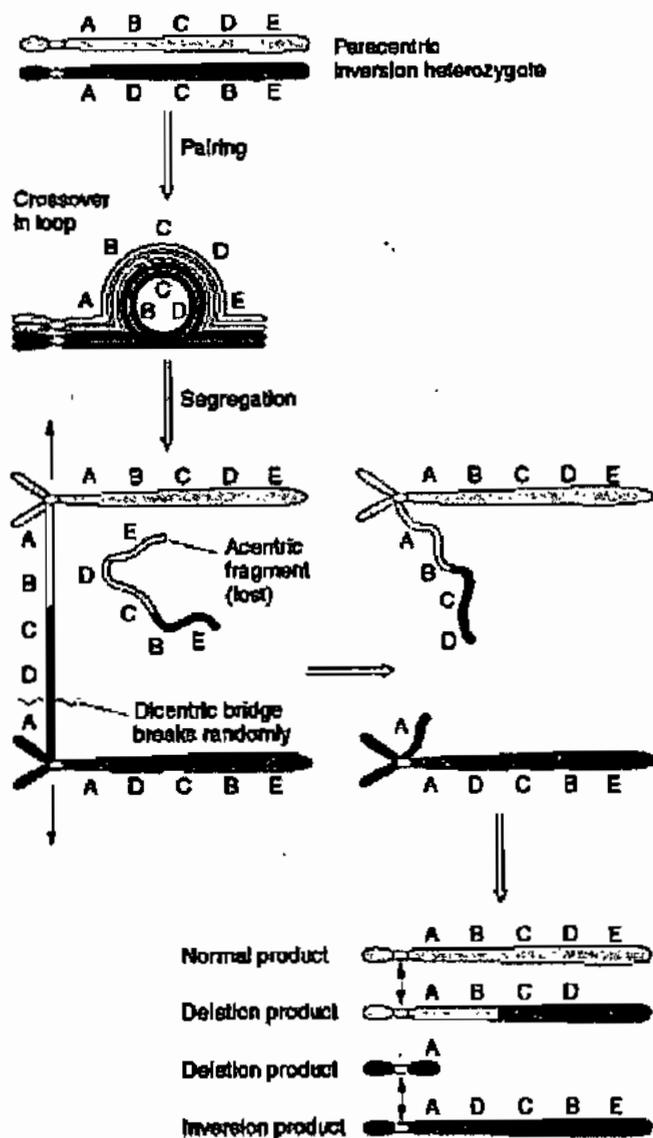


Figura 4.- Inversión paracéntrica al estado heterocigoto, configuración que los cromosomas adoptan durante la meiosis y los productos resultantes de la ocurrencia de un crossing-over al interior del asa, al término de las Meiosis I y II.

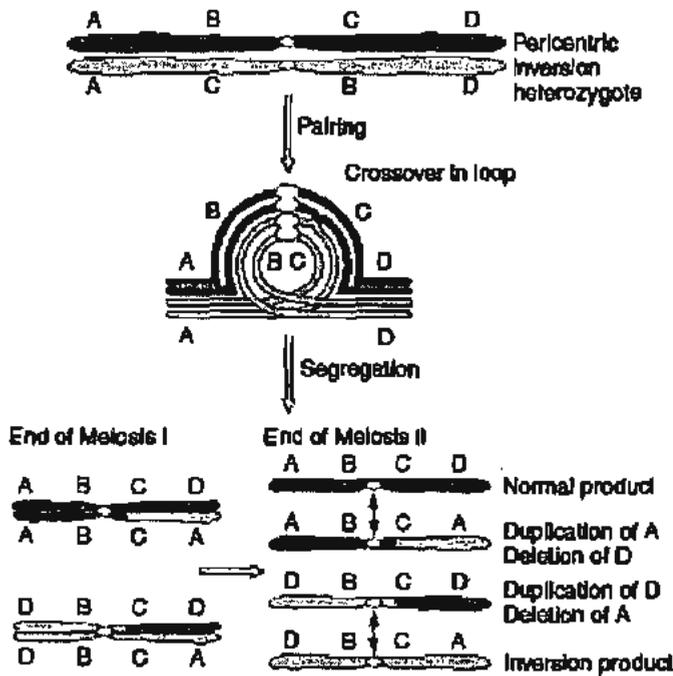


Figura 5.- Inversión pericéntrica al estado heterocigoto, configuración que los cromosomas adoptan durante la meiosis y los productos resultantes de la ocurrencia de un crossing-over al interior del asa, al término de las Meiosis I y II.

c) Translocaciones.-

Cuando las fracturas se producen en dos cromosomas no homólogos, existen diversas formas de reunión de los segmentos cromosómicos resultantes de la rotura. Una de las más interesantes es la **translocación recíproca**, esto es el intercambio de los segmentos cromosómicos originados por las fracturas, entre los cromosomas involucrados. El organismo portador de esta translocación posee todo el material genético que posee uno no translocado. Las consecuencias de una translocación son: la creación de un nuevo grupo de ligamiento génico, la activación o inactivación de algunos genes por ocurrencia del efecto de posición y la semiesterilidad de los individuos portadores de la translocación por producción de gametos inviables que contienen defecciones y duplicaciones génicas.

Un ejemplo bien conocido de una translocación recíproca humana que ocurre en células somáticas, específicamente en células de la médula ósea, es la translocación entre los cromosomas 9 y 22 (Figura 6). Por ocurrir en células somáticas, esta translocación no es transmitida a la descendencia y sus efectos sólo son sufridos por el individuo que la porta. La relación causal entre la ocurrencia de la translocación y la aparición de un tipo de cáncer a la médula, llamado leucemia mieloide crónica, está actualmente bien documentada. Como efecto de la translocación, el proto-oncogen *ABL* que codifica para una enzima tirosina kinasa, es movido desde su posición normal en el extremo del brazo largo del cromosoma 9 a una región del brazo largo del cromosoma 22, donde se encuentra el gen *BCR*, de función desconocida. La yuxtaposición de las secuencias *ABL* y *BCR* forma un gen quimérico, que codifica para la síntesis de una proteína que es más larga que la proteína *ABL* normal y cuya actividad tirosina kinasa está aumentada. Aunque las funciones de las proteínas *ABL* y *BCR* no están del todo claras, si está demostrado que la actividad aumentada de la nueva proteína tirosina kinasa, codificada por el gen quimérico, es el evento primario que desencadena la leucemia mieloide crónica.

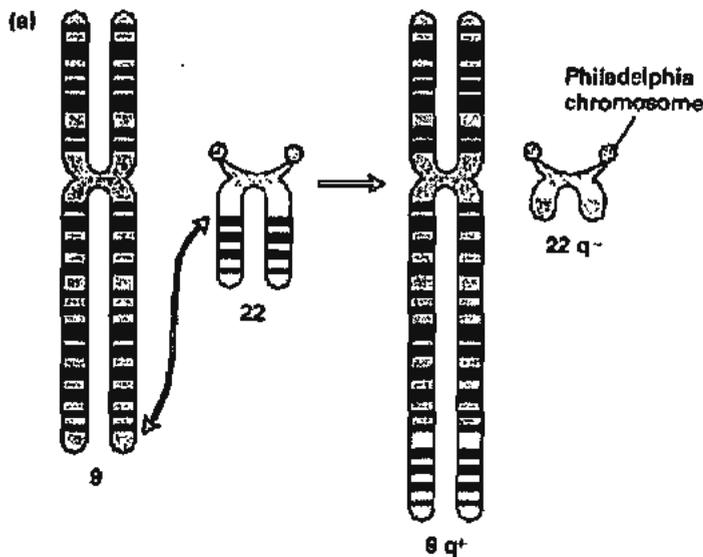


Figura 6.- Representación de la translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 humanos, que es causante de la leucemia mieloide crónica. El cromosoma 22 formado como consecuencia de la translocación, es más pequeño que el original y recibe el nombre de cromosoma Filadelfia.

2.2.- MUTACIONES CROMOSÓMICAS DE NÚMERO

Son cambios en el número de cromosomas característicos de la especie. Entre ellas están las **euploidías** o ploidías verdaderas, en las que todo un complemento cromosómico (n), se encuentra repetido en el genoma. Es el caso de las triploidías ($3n$), tetraploidías ($4n$) y, en general, las poliploidías, muy frecuentes entre las especies vegetales, pero poco frecuentes en animales. En el hombre, se producen cigotos triploides pero ellos no son viables, siendo abortados en etapas tempranas del desarrollo (un 7% de los abortos espontáneos tempranos corresponden a conceptos triploides).

Por otra parte están las **aneuploidías**, las que corresponden a cambios del número cromosómico de la especie que son inferiores al número de cromosomas correspondiente a una dotación cromosómica. Entre las aneuploidías se distinguen las : nulisomías ($2n - 2$), monosomías ($2n - 1$), trisomías ($2n + 1$), tetrasomías ($2n + 2$) y polisomías ($2n + n$).

a) Monosomías.- En este caso el individuo tiene un cariotipo al que le falta un cromosoma. La única monosomía viable en la especie humana, detectable en nacidos vivos y adultos, es la que afecta a los cromosomas X y origina el **síndrome de Turner**. Se presenta con una frecuencia de 1/ 5.000 mujeres nacidas vivas. En este caso los individuos tienen una constitución cromosómica igual a $45, X$, poseen un fenotipo femenino e inteligencia normal, pero presentan una serie de anomalías fenotípicas. Entre estas las más importantes y frecuentes son la infertilidad, la estatura baja, y la presencia de cuello alado (un cuello que se extiende hacia los hombros) (Figura 7).

El análisis citogenético de abortos espontáneos tempranos y, también de gametos masculinos y femeninos, ha revelado que se producen monosomías para prácticamente todos los autosomas humanos, pero ninguna de ellas es viable.

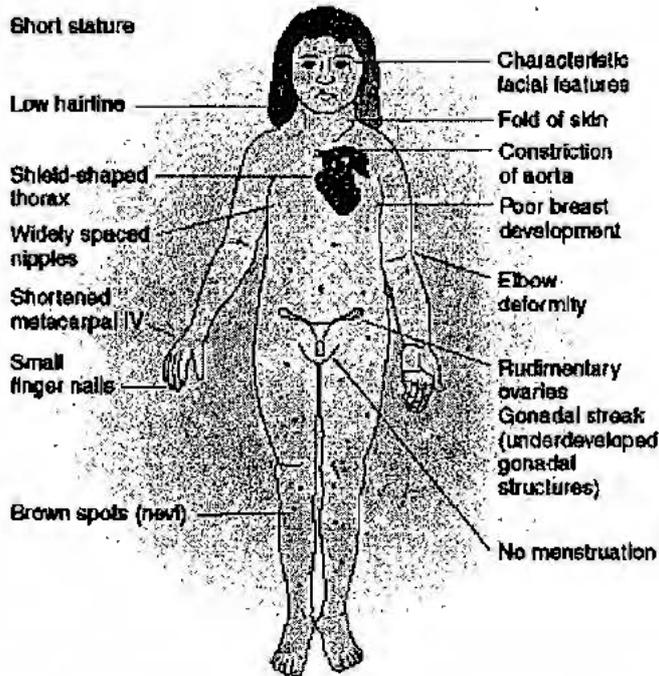


Figura 7.- Características fenotípicas principales del síndrome de Turner, el que resulta de tener un solo cromosoma X y una constitución cromosómica igual a 45, X.

b) Trisomías.- Entre las trisomías viables se encuentra las que afectan a los cromosomas sexuales (47, XXY; 47, XXX) y las relacionadas con los autosomas, como la trisomía para el cromosoma 21 (47, XY (o XX), 21⁺).

Un individuo trisómico para los cromosomas sexuales con una constitución cromosómica 47, XXY, presenta un conjunto de características fenotípicas conocidas como **síndrome de Klinefelter**, el que se presenta con una frecuencia de 1/1.000 varones nacidos vivos. Estos individuos tienen fenotipo varón, son infértiles, mentalmente retardados y tienen estatura alta, entre sus principales características (Figura 8).

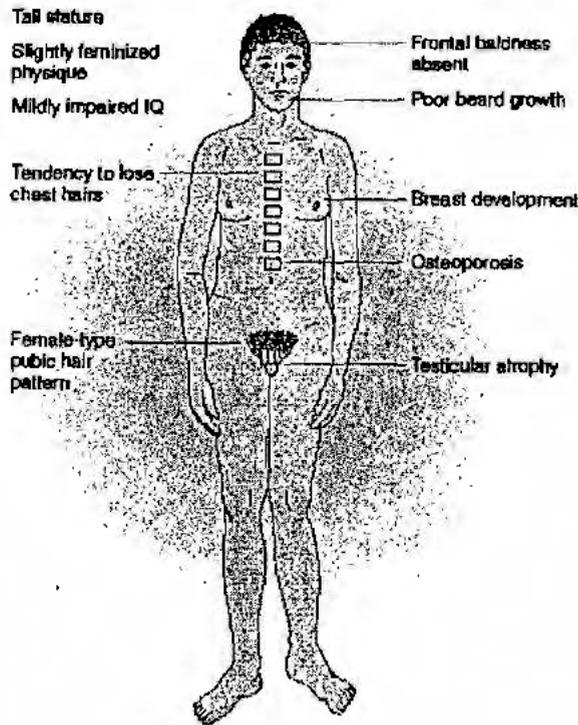


Figura 8.- Características fenotípicas principales del síndrome de Klinefelter, el que resulta de tener tres cromosomas sexuales y una constitución cromosómica igual a 47, XXY.

Un individuo trisómico para el cromosoma 21 presenta un conjunto de características fenotípicas conocidas como **síndrome de Down** (Figura 9). Este síndrome es una de las anomalías cromosómicas más frecuentes en los seres humanos y su frecuencia es de un 0.5 % de todas las concepciones y de 1/900 de los nacidos vivos. Las personas afectadas presentan retraso mental y del crecimiento corporal, tienen un cráneo ancho y más aplanado por detrás que lo normal, los párpados tienen un pliegue particular, parecido al de individuos normales de origen asiático, la lengua suele sobresalir de la boca, haciendo que esta permanezca semiabierta (Figura 9). Los progresos experimentados por la medicina en las últimas décadas, han logrado que la supervivencia de estos individuos aumente espectacularmente. Así, actualmente la mayor parte de ellos llega a la vida adulta, siendo relativamente frecuente que alcancen los 50 años de edad.

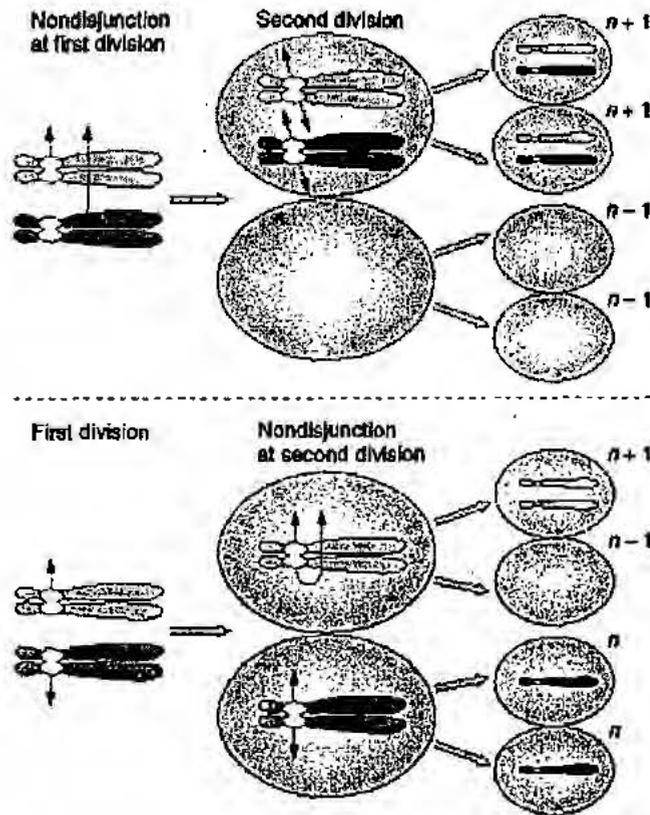


Figura 11.- No-disyunción cromosómica en la meiosis I y II y sus consecuencias en la constitución cromosómica de los gametos resultantes.

V.- PREGUNTAS ORIENTADORAS (a contestar por los alumnos):

1. Explique en que consisten las deleciones, duplicaciones e inserciones génicas. ¿Qué efectos tienen estas mutaciones génicas sobre el mensaje genético?
2. Una sustitución génica puede no tener ningún efecto fenotípico o producir un cambio fenotípico severo. Explique estas dos situaciones y de ejemplos para cada una de ellas.
3. ¿Qué son las mutaciones cromosómicas estructurales? Señale ejemplos concretos de deleciones y translocaciones en la especie humana, indicando en cada caso los efectos fenotípicos derivados.
4. ¿Qué son las aneuploidías? ¿Cómo se producen y qué efectos fenotípicos tienen? Explique dando un ejemplo que involucre a los autosomas y otro, que comprometa a los cromosomas sexuales.

Material Complementario

Clase

Miercoles 18 de Enero de 2006

“GENOMA HUMANO: TAMAÑO, ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN”

Profesora: LAURA WALKER B.

GENOMA HUMANO: TAMAÑO, ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN

PROFESORA: LAURA WALKER B.

I. Introducción

Con el objetivo principal de conocer la secuencia completa de nucleótidos del DNA nuclear humano se elaboró el **Proyecto Genoma Humano** (PGH). Este es un proyecto internacional que surgió bajo el amparo del Departamento (Ministerio) de Energía (DOE) y del Instituto Nacional de Salud (NIH) de Estados Unidos. El proyecto comenzó oficialmente, en 1990 y disponía de 15 años, es decir hasta el año 2005, para cumplir con los objetivos propuestos. Sin embargo, ya en Junio de 2000, los Directores del Proyecto anunciaron al mundo que la meta principal del PGH se había cumplido, puesto que el 90% de los 3.000 millones de nucleótidos que componen el genoma humano estaban ya secuenciados. Actualmente se continua trabajando para terminar la secuenciación y se han iniciado las primeras comparaciones con otros genomas ya conocidos.

Entre los principales aportes realizados por el Proyecto Genoma Humano se encuentran los siguientes hallazgos: la distribución cromosómica de los genes que codifican para proteínas o RNA, es altamente no uniforme; la proporción del DNA total que contiene genes codificantes activos o potencialmente activos es extraordinariamente baja; el DNA que se encuentra localizado entre los genes es muy heterogéneo.

Paralelamente al Proyecto Genoma Humano se están llevando a cabo otros Proyectos Genomas en una serie de organismos procariontes y eucariontes. Estos Proyectos se encuentran en distintas etapas de avance, habiendo llegado a su fin los relacionados con los genomas más pequeños, como los de algunos virus y bacterias, cuyos genomas están ya completamente secuenciados. La mayor parte de los genomas eucariontes en análisis, corresponden a organismos "modelos", ya que históricamente han sido intensamente utilizados para realizar análisis genético. Es el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la mosca *Drosophila melanogaster*, el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, la planta *Arabidopsis thaliana* y el ratón *Mus musculus domesticus*.

El análisis del conjunto de los resultados que están emergiendo de los distintos Proyectos Genomas es de gran importancia para el desarrollo futuro de la genómica, principalmente, porque permite tener una visión global de la arquitectura de los genomas; disponer de bases de datos importantes sobre la localización de genes y segmentos de DNA no codificantes, y comprender cómo el genoma de los distintos organismos ha sido remodelado en el curso de la evolución.

II. Objetivos

- a) Conocer la variación del tamaño del genoma y su relación con el número de genes codificantes y la complejidad de los organismos, en procariontes y distintos grupos de eucariontes, incluido el hombre.
- b) Conocer algunas de las propiedades y funciones, así como, el probable origen de los distintos tipos de DNA humanos que no codifican para proteínas o RNA.
- c) Reconocer patrones de distribución de: secuencias codificantes; pares de bases nucleotídicas G-C y A-T, e islas CpG, en diferentes compartimientos cromosómicos humanos.
- d) Manejar la terminología utilizada en el mapeo genético y citogenético.

III. Bibliografía

- a) Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC and Gelbart WM. "An Introduction to Genetic Analysis". WH Freeman and Company. N. Y. First Edition, 1999. Chapter 14.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>
- b) Strachan T. and Read AP. "Human Molecular Genetics". John Wiley & Sons, Inc., Publication. N. Y. Second Edition, 1999. Chapters 7 and 13.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>
- c) Walker LI. "Citogenética General: Cromosomas y Cariotipos". Capítulo 27, en "Elementos de Biología Celular y Genética", editado por el ex Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Segunda Edición, 1993.
- d) Apuntes de las clases respectivas.
- e) International Human Genome Sequencing Consortium. "Initial sequencing and analysis of the human genome". Nature, vol. 409, 15 Feb., 2001, pp. 860 - 921. (Primer informe sobre el desarrollo del Proyecto Genoma Humano).
- f) <http://genome.cbs.dtu.dk/databases/DOGS/index.html> (Contiene tamaños genómicos de numerosas especies de procariontes y eucariontes).
- g) <http://www.cbs.dtu.dk/services/GenomeAtlas/index.html> (Contiene número de genes codificantes para genomas de muy distintos tamaños, desde virus a eucariontes pluricelulares).
- h) http://hgp.gsc.riken.go.jp/chr21/chr21_fig1.html (Mapa genético y citogenético del cromosoma 21 humano)
- i) <http://www.ensembl.org/> (Contiene el número y la distribución de los genes en cada uno de los cromosomas humanos).

IV. Actividades

1. TAMAÑO GENÓMICO: LA PARADOJA DEL VALOR DE C DNA

El tamaño del genoma nuclear es un rasgo generalmente constante para la especie, en células que tengan el mismo nivel de ploidía y que estén en la misma etapa del ciclo celular. Este carácter presenta un espectacular rango de variación entre los organismos, de aproximadamente seis órdenes de magnitud, si se consideran virus, bacterias, vegetales y animales.

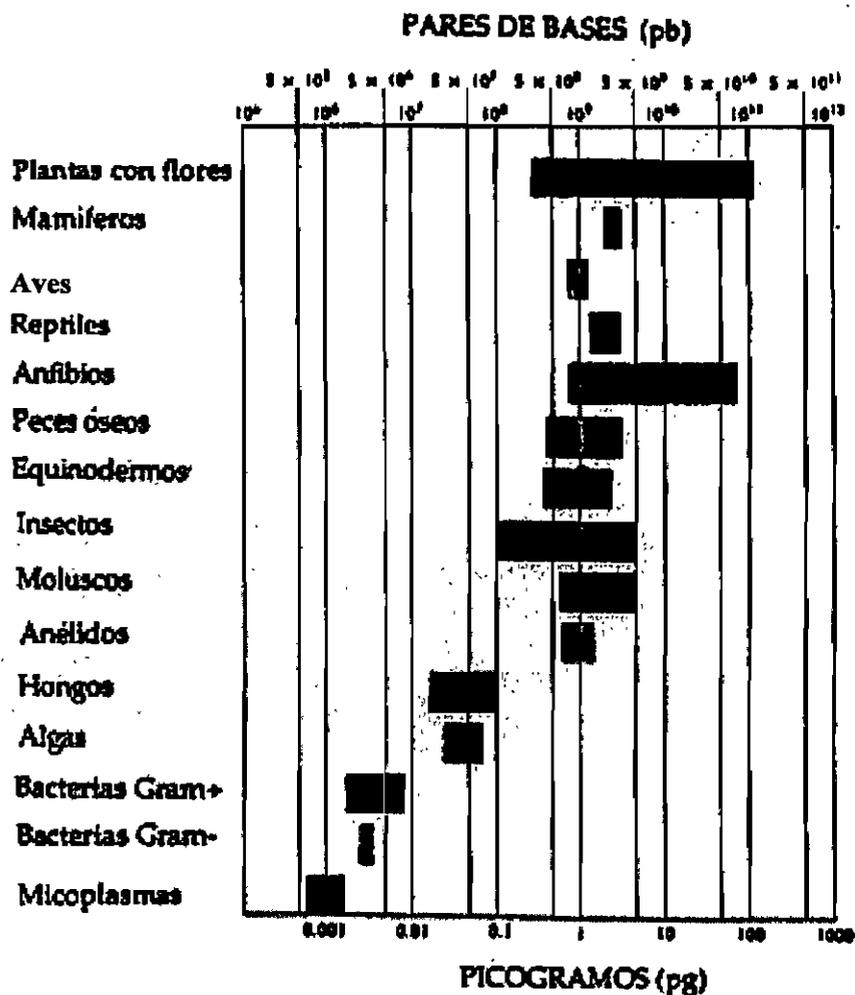


Figura 1.- Tamaños genómicos haploides, expresados en picogramos (1×10^{-12} g; escala inferior) y pares de bases nucleotídicas (escala superior), para procariontes y eucariontes vegetales y animales. (Adaptado de "Elementos de Biología Celular y Genética", Capítulo 27: "Citogenética General; Cromosomas y Cariotipos", 1993).

- 1.1 ¿Tienen los distintos grupos de organismos, representados en la Figura 1, el mismo grado de variabilidad para tamaño genómico? Indique los grupos de organismos que según la Figura, aparecen como los más conservadores y los que aparecen como los más variables para tamaño del genoma.

- 1.2 Actualmente, y como consecuencia del desarrollo de los distintos Proyectos Genomas, se ha estimado el número de genes codificantes para proteínas, de distintos organismos procariontes y eucariontes de tamaño genómico conocido (Tabla 1). El número de genes codificantes por genoma puede considerarse como un estimador adecuado del grado de complejidad de los organismos involucrados.

TABLA 1.- NÚMERO DE GENES CODIFICANTES ESTIMADOS Y TAMAÑOS GENÓMICOS EN PROCARIONTES Y EUKARIOTES.

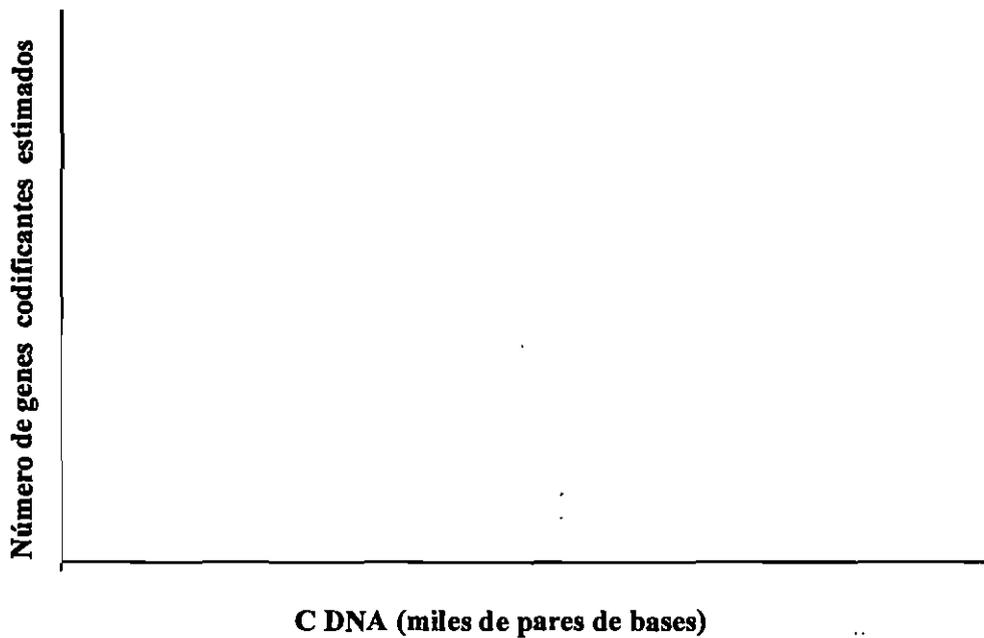
Procariontes	C DNA *	Nº de genes (estimados)
<i>Buchnera species</i>	640.681	564
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	1.230.230	1.052
<i>Haemophilus influenzae</i>	1.830.138	1.709
<i>Helicobacter pylori</i>	1.667.867	1.566
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4.411.529	3.918
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	816.394	677
<i>Neisseria meningitidis</i>	2.272.351	2.025
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.813.641	2.595
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2.160.837	2.094
<i>Xilella fastidiosa</i>	2.679.306	2.766

Eucariontes	C DNA *	Nº de genes (estimados)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12.000.000	5.800
<i>Arabidopsis thaliana</i>	115.000.000	25.498
<i>Caenorhabditis elegans</i>	97.000.000	19.099
<i>Drosophila melanogaster</i>	116.000.000	13.601
<i>Anopheles gambiae</i>	278.000.000	14.653
<i>Danio rerio (zebra fish)</i>	1.560.000.000	20.000
<i>Mus musculus</i>	2.490.000.000	24.948
<i>Ratus norvegicus</i>	2.570.000.000	21.276
<i>Homo sapiens</i>	2.693.000.000	30.000

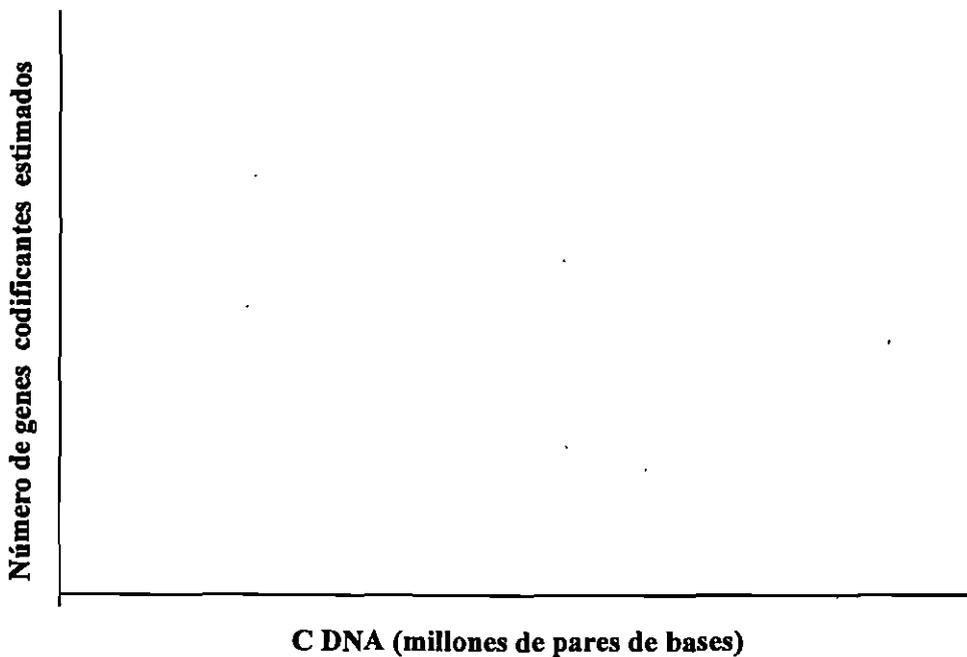
*C DNA = Cantidad de DNA por genoma haploide, estimada en pares de bases nucleotídicas.

- a) Construya gráficos que representen el tamaño genómico *versus* el número de genes codificantes estimados para: i) procariontes; ii) eucariontes.

i) **C DNA Y NÚMERO DE GENES CODIFICANTES EN PROCARIONTES**



ii) **C DNA Y NÚMERO DE GENES CODIFICANTES EN EUCARIONTES**



- b) ¿Existe relación directa entre cantidad de DNA y complejidad de los organismos, estimada por el número de genes codificantes? Dé al menos dos argumentos que apoyen su afirmación y que estén basados en la Figura 1 y en los dos gráficos construidos por Ud. en a).

- c) ¿Qué diferencia presenta el genoma humano respecto del genoma de los otros eucariontes, incluidos en la Tabla 1?

- 1.3 ¿Qué se entiende por paradoja del valor de C DNA? Explique y fundamente.

- 1.4 En la especie humana el número promedio de nucleótidos de las secuencias codificantes es de 1.340 pb, el número de genes fluctuaría entre 30.000 a 40.000 y el número total aproximado de pares de bases de todo el genoma es de 3×10^9 pb. Con estos datos, calcule los porcentajes de DNA codificante y no codificante presentes en el genoma humano.

2. HETEROGENEIDAD GENÓMICA

Actualmente se conocen los mapas genéticos y citogenéticos de la mayoría de los cromosomas humanos. Para la realización de esta actividad se utilizará el mapa del cromosoma 21 humano, el que hemos reproducido en un poster y también en la Figura 2 de esta guía. Este mapa está disponible en la red en la siguiente dirección: http://hgp.gsc.riken.go.jp/chr21/chr21_fig1.html

En el poster y en la Figura 2, aparecen representados los siguientes componentes del cromosoma 21 humano:

- las bandas G+ y G-
- la localización de los genes conocidos en las dos hebras del DNA (+) y (-)
- la localización de las islas CpG a lo largo del cromosoma
- la abundancia relativa en nucleótidos G-C y en las familias de DNA Alu (SINES) y Line1 (LINES) a lo largo del cromosoma .

2.1 Calcule la densidad génica para cada una de las bandas G+ y G-. (Densidad génica = N° de genes / Megabases de DNA).

2.2 Calcule la densidad de las islas CpG para cada una de las bandas G+ y G-. (Densidad de islas CpG = N° de islas / Megabases de DNA).

2.3 ¿Existen diferencias en la densidad de genes y de islas CpG entre las bandas claras y oscuras? Explique.

2.4 ¿Qué relación general puede establecer entre la densidad de los genes y la de las islas CpG? De una explicación funcional para la relación encontrada.

2.5 Describa la relación que, en general, se observa a lo largo del cromosoma entre densidad génica y riqueza relativa en nucleótidos G-C, Alu y Line1.

2.6 ¿Existe un gradiente de densidad génica a lo largo de este cromosoma? Explique.

2.7 Infórmese acerca de si las características encontradas y analizadas anteriormente (2.1 a 2.6) son únicas del cromosoma 21 o son comunes para todos los cromosomas humanos.

En la figura 3 aparecen representados los mapas genéticos y citogenéticos de todos los cromosomas humanos.

2.7 Calcule la densidad génica de cada cromosoma humano (considere sólo los genes conocidos):

2.8 ¿Existen diferencias entre las densidades génicas de los distintos cromosomas?. Explique.

2.9 Las características de la distribución de los genes a lo largo del cromosoma 21 ¿son comunes para todos los cromosomas humanos o son únicas de ese cromosoma?. Explique.

FIGURA 2.- MAPA DEL CROMOSOMA 21 HUMANO

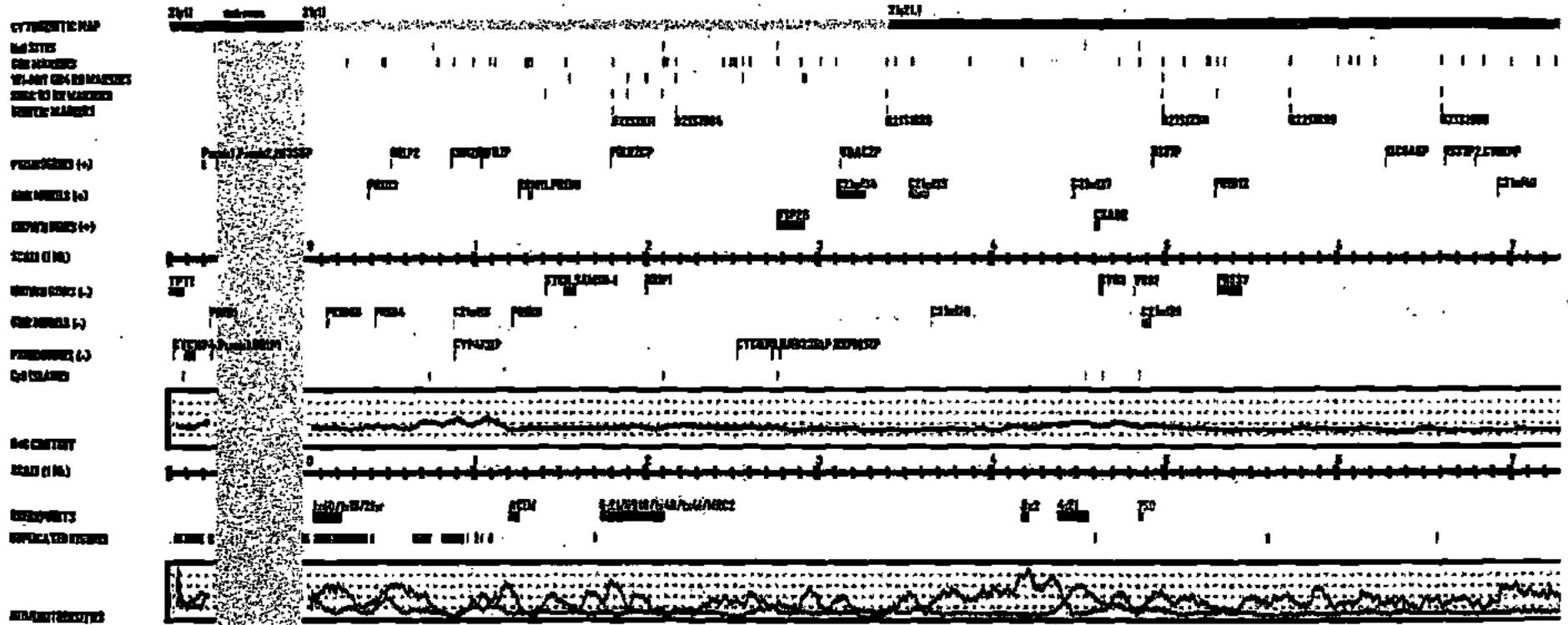


FIGURA 2.- MAPA DEL CROMOSOMA 21 HUMANO

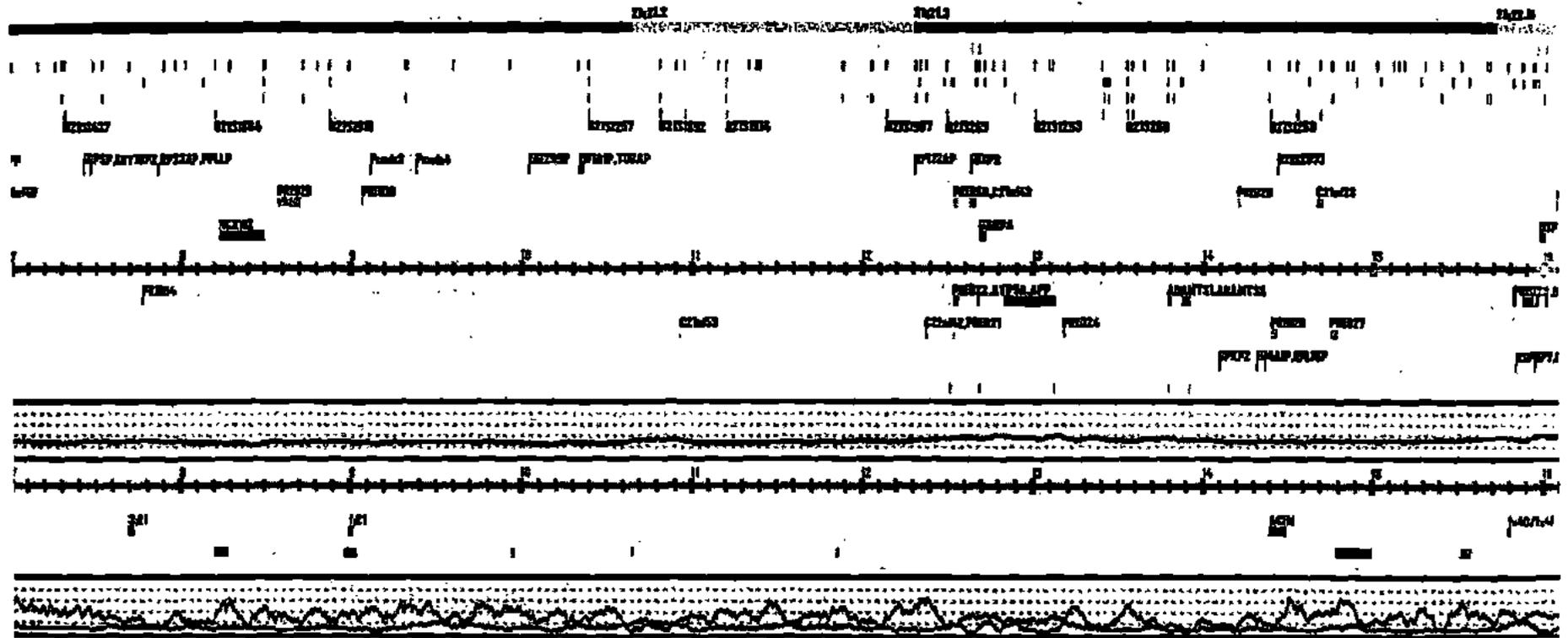
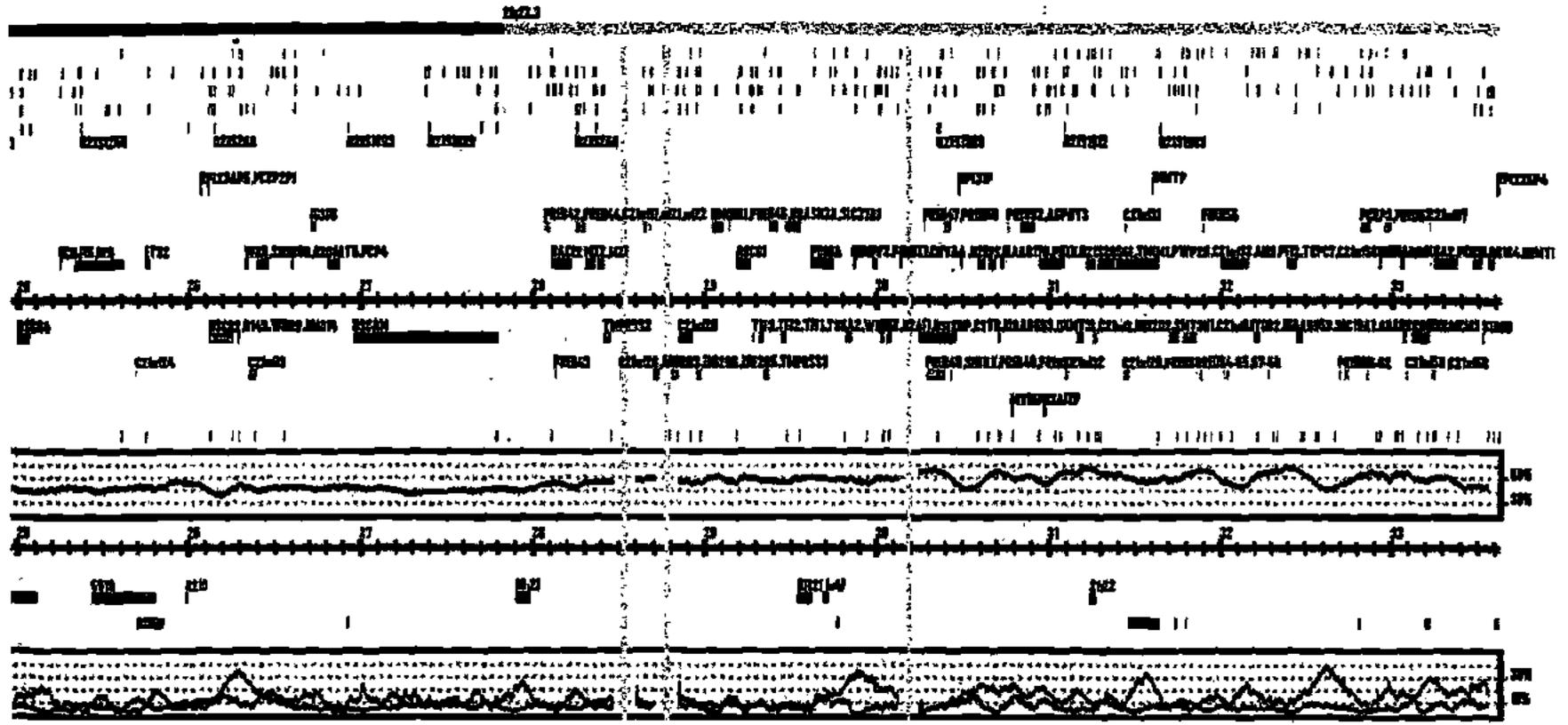
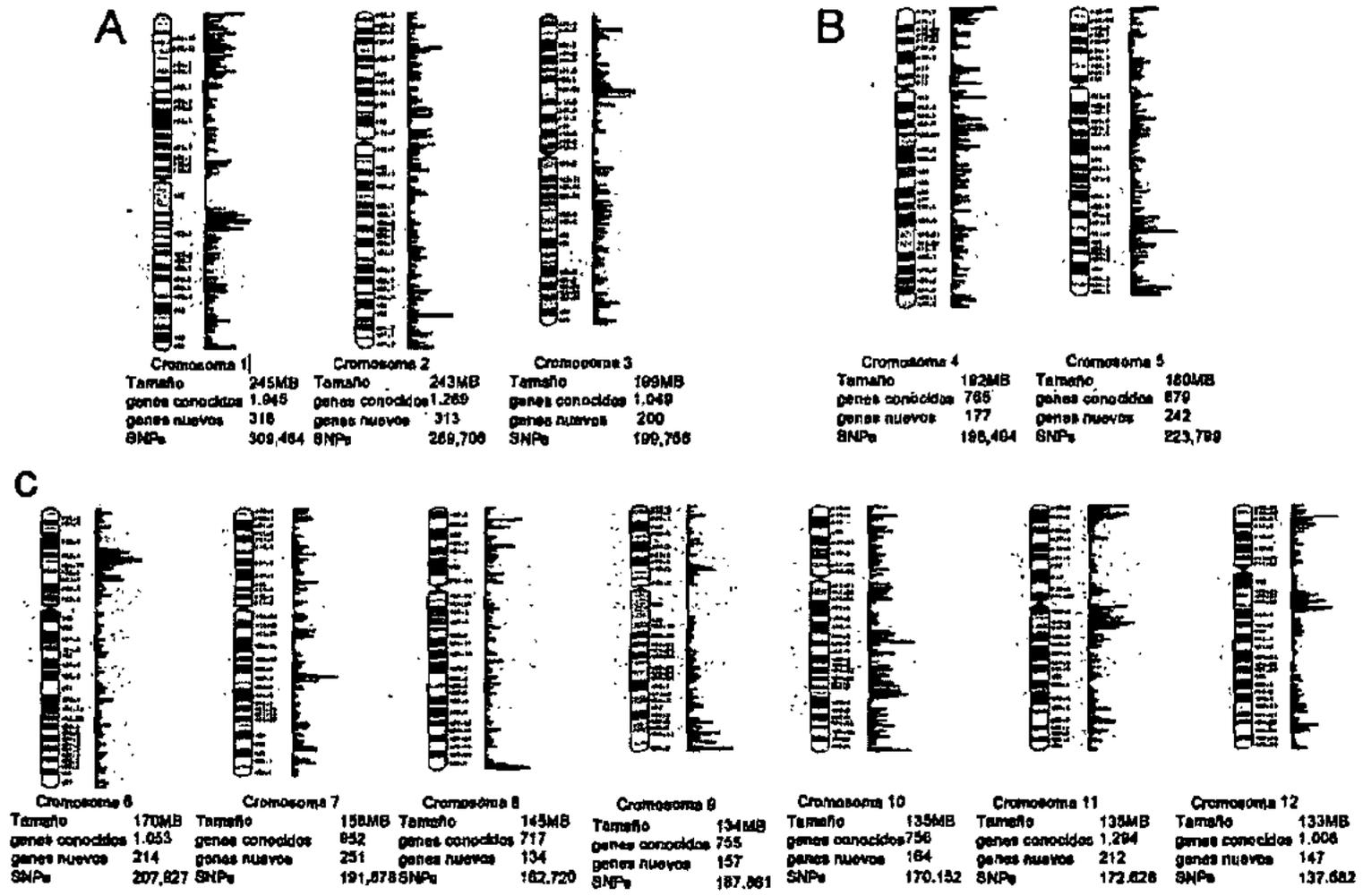
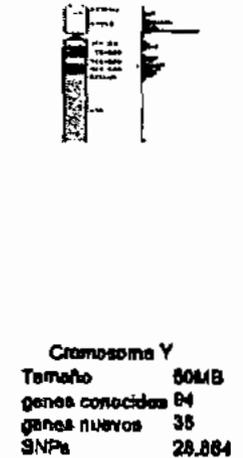
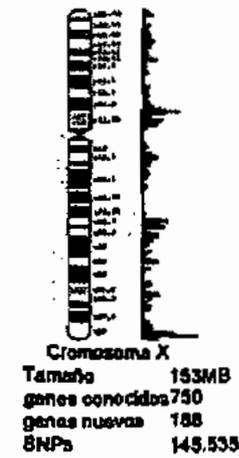
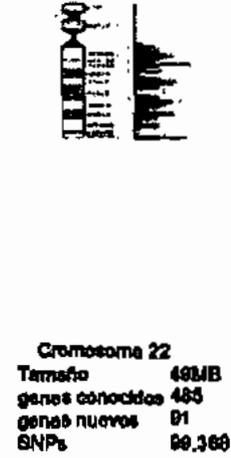
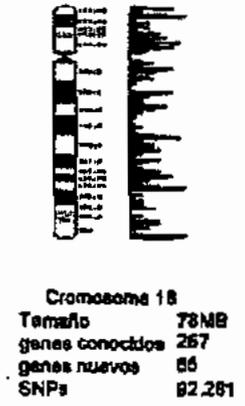
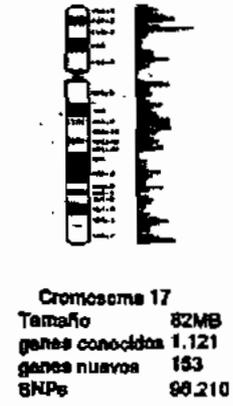
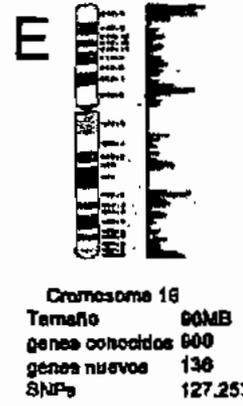
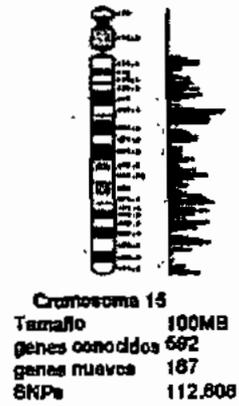
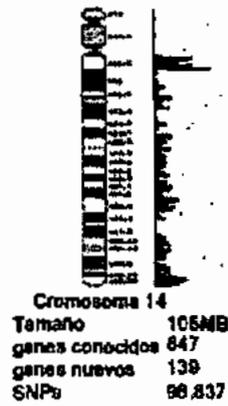


FIGURA 2.- MAPA DEL CROMOSOMA 21



¹⁴ FIGURA 3. Cariotipo Humano y distribución de genes por cromosoma





3. EL SECTOR DEL GENOMA QUE NO CODIFICA

La fracción del genoma humano que no codifica y cuyas secuencias no se relacionan con los genes, como los intrones o los pseudogenes, constituye entre el 70 % al 80 % del total del genoma. Una parte importante de este DNA no codificante está formado por DNA moderada o altamente repetido (20 % - 30 %), el que puede presentarse agrupado o disperso a lo largo del genoma.

3.1 ¿Qué se entiende por DNA repetido?

En las siguientes Tablas (Tablas 2 y 3) se señalan las principales características de los distintos tipos de DNA repetido agrupado y disperso, y en la Figura 3 la localización cromosómica de ellos.

TABLA 2.- CARACTERÍSTICAS DE LOS DISTINTOS TIPOS DE DNA REPETIDO AGRUPADO

	Tipos de DNA repetido agrupado			
	Satélite clásico	Minisatélite telomérico	Minisatélite hipervariable	Microsatélite
Longitud del fragmento de repetición	171 pb (α DNA centromérico humano)	6 pb*	9 - 64 pb	1 pb - 6 pb
Grado de repetición	100 kb - 5.000 kb	100 pb - 20 kb	100 pb - 20 kb	150 pb (máximo)
Localización cromosómica	Centrómeros	Telómeros	Regiones subteloméricas	Distintas regiones cromosómicas

* (TTAGGG) $_n$ = secuencia telomérica común para los vertebrados

TABLA 3.- CARACTERÍSTICAS DE LOS DISTINTOS TIPOS DE DNA REPETIDO DISPERSO

	Tipos de DNA repetido disperso	
	SINES	LINES
Familia más representativa	Alu	Line-1
Longitud del fragmento de repetición	250 pb	6.000 pb
Grado de repetición	60.000 x - 100.000 x	60.000 x - 100.000 x
Localización cromosómica	*Bandas G ⁻	*Bandas G ⁺
Composición nucleotídica principal	G-C	A-T

* Corresponde a 13 % - 16 % de una banda cromosómica; SINES = short interspersed nuclear elements; LINES = long interspersed nuclear elements.

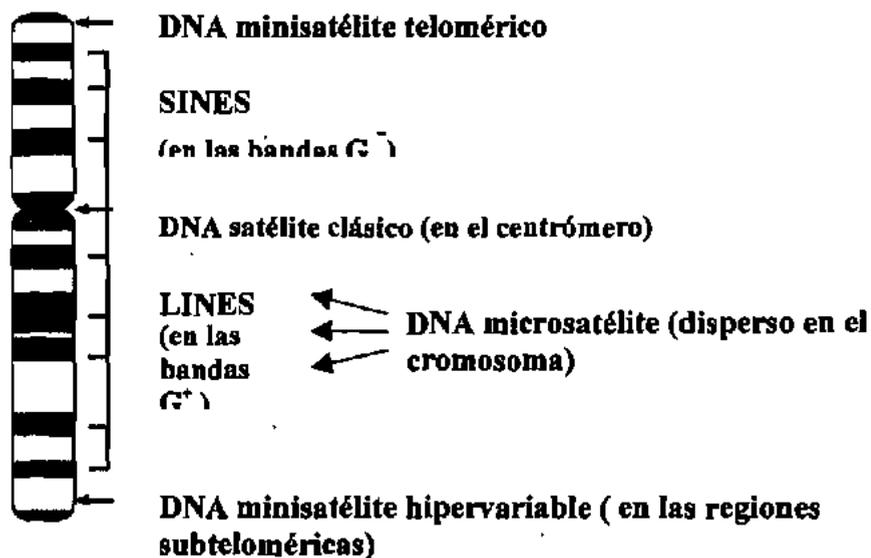


Figura 4. Localización cromosómica de los distintos tipos de DNA repetido.

3.2 ¿Qué funciones desempeñarían los distintos tipos de DNA repetido agrupado y repetido disperso?

3.3.- Infórmese acerca de las formas como se habría originado el DNA repetido agrupado y el DNA repetido disperso.

Material Complementario

Práctico

Martes 17 de Enero de 2006

**“EXTRACCIÓN DE ADN, PCR Y MARCADORES
MOLECULARES”**

Profesores: CRISTIAN ARANEDA
CECILIA BAGINSKY

TALLER DE ENTRENAMIENTO EN TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS.
Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile
Enero 2006

Profesores.

Dra. Marina Gambardella (mgambard@uchile.cl)
Dr. Cristian Araneda (craaned@uchile.cl)
Dra. Cecilia Baginsky (cbaginsky@uchile.cl)

OBJETIVO:

Proporcionar a los alumnos-participantes los conocimientos básicos acerca de procedimientos de laboratorio. Se realizarán diferentes actividades, las cuales han sido seleccionadas y programadas de tal forma que los participantes puedan dimensionar el grado de complejidad de los procesos y los tiempos necesarios para ellos.

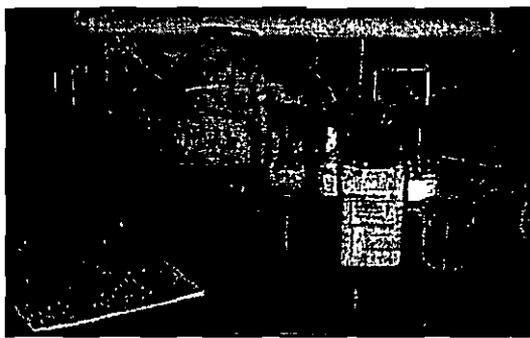
ACTIVIDADES:

1. Extracción de ADN (Método con Materiales Caseros).

Se usará una técnica sencilla para extraer el ADN de un tejido vegetal. Se podrá así visualizar y confirmar su estructura fibrilar.

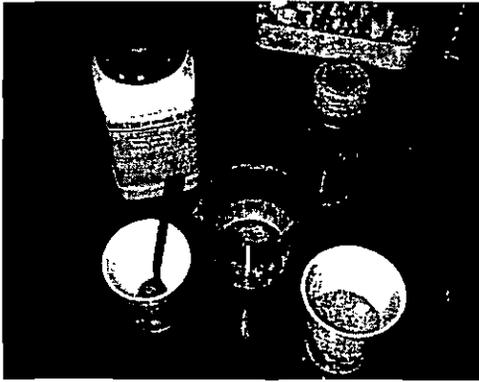
Materiales

½ Plátano	Alcohol de 95% (Frío -20 °C)
Mondadientes	Sal (Cloruro de sodio)
2 Vasos plásticos	Champú (Detergente)
1 Vaso precipitado 250 mL	Papel Filtro
1 tubo Eppendorf de 1,6 mL	Platillo de postre, tenedor y cuchara de té.
200 mL Agua destilada.	Papel Filtro

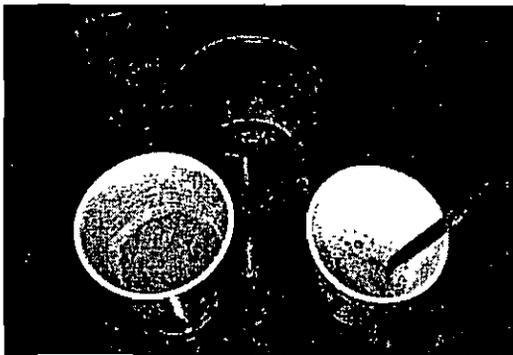


Procedimiento:

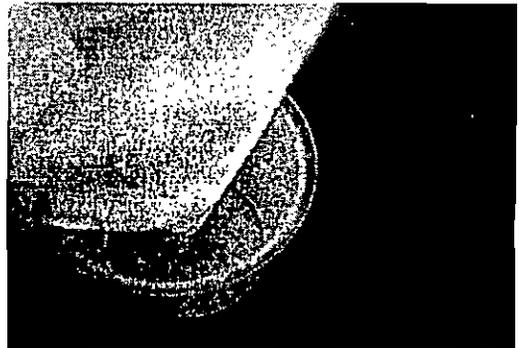
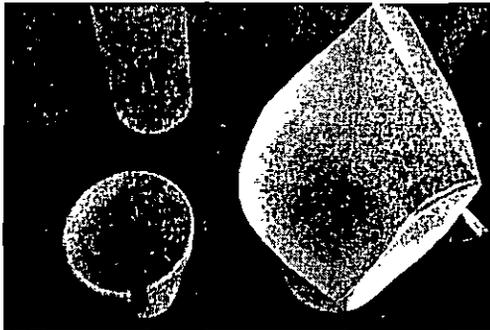
1. Colocar 25 mL de alcohol (etanol) en un freezer o en una caja con hielo.
2. Moler medio plátano pelado en el platillo lo más homogéneamente posible y agregarlo a un vaso plástico que contenga 200 mL de agua.
3. En otro vaso plástico agregar 2 cucharaditas de champú, 2 gr de sal y las 4 cucharadas de agua destilada y homogeneizar (revolver) suavemente.



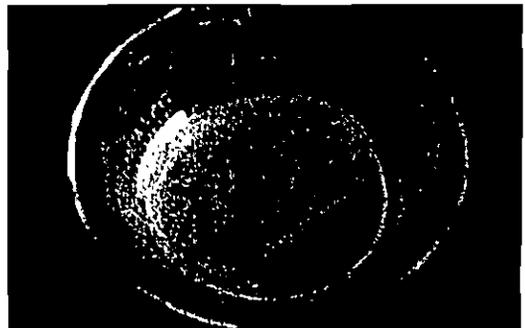
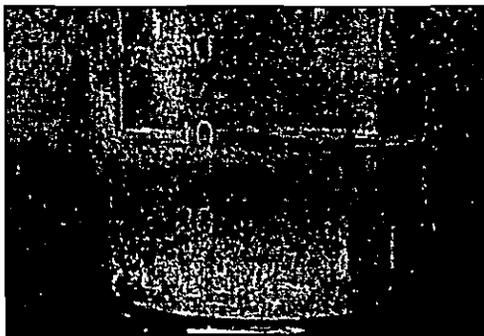
4. A la taza que tiene el champú se le agregan 6 cucharaditas de la solución de plátano y homogeniza (revuelve) suavemente por 10 minutos.



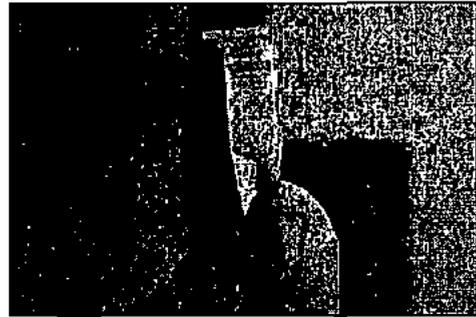
5. Hacer un embudo con el papel filtro y colocarlo sobre el vaso precipitado sin que tope el fondo y filtrar la mezcla obtenida en el paso 4.
6. Dejar pasar la solución filtrando hasta tener aprox. 5 ml de filtrado (basta que cubra el fondo del vaso).



7. Agregar alcohol frío a la solución de plátano filtrada, y dejar reposar 2 a 3 minutos. Se formará un moco blanco que corresponde al ADN.



8. Enrolle el ADN en un mondadiente y transfiera a un tubo Eppendorf. Se puede dejar evaporar el alcohol y resuspender el ADN en agua destilada estéril para uso inmediato o para una conservación prolongada en una solución de tampón TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) y almacenarlo a -20 o -80 °C.

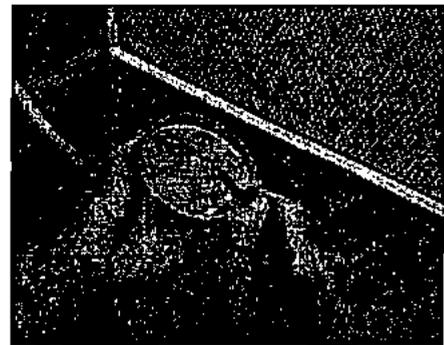


Explicación:

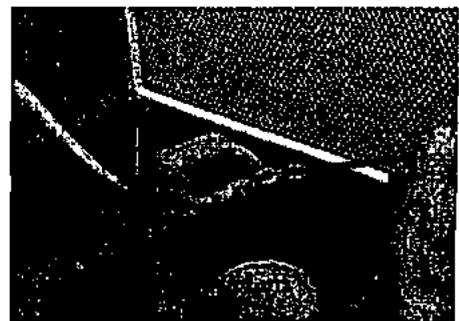
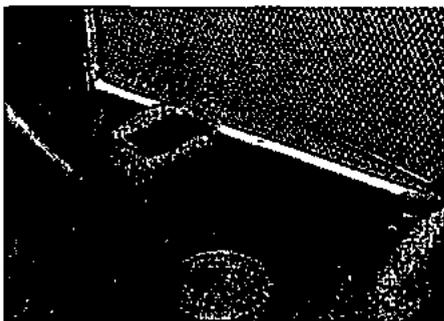
El detergente rompe la membrana celular disolviendo los lípidos (moléculas de grasas) y las proteínas de la célula, además rompe las uniones que mantienen la estructura de la membrana celular. Después, el detergente se une con estos lípidos y proteínas, permitiendo su eliminación de la solución por la filtración. EL ADN genómico queda en el líquido que no se retiene en el filtro. La sal (iones Mg y Cl) permite precipitar el DNA presente en el filtrado usando una solución alcohólica fría.

2. Extracción de ADN total de bacterias fijadoras de nitrógeno a través de resuspensión de células.

1. Tomar un pegote de células de *Rhizobium* que han crecido en placas de YMB (medio extracto de levadura-manitol).



2. Introducir este pegote en un tubo eppendorf que contenga 20 μ l de solución 0,05 M de NaOH y 0,25% de detergente SDS (Sodio dodecil sulfato).



3. Mezclar en un Vortex hasta conseguir una mezcla homogénea.



4. Visualizar el ADN en un gel de Agarosa.



3. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa.

La electroforesis en general permite la separación de moléculas como consecuencia de su diferente movilidad en un campo eléctrico. Por lo tanto la velocidad de migración depende de la carga eléctrica y del tamaño de la molécula. El soporte (gel) ofrece una resistencia fuerte al avance de las moléculas, y es mayor mientras mayor sea la concentración de agarosa que se utilice (poros más pequeños).

Las moléculas de ADN y ARN son generalmente demasiado grandes para que avancen a través de estos geles, por lo tanto normalmente es necesario fragmentarlas.

La agarosa es un polisacárido (originalmente obtenido de algas como el agar-agar pero de composición más homogénea) cuyas diluciones (entre 0,5 a 2%) poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de 50°C, y formar un gel semi-sólido al enfriarse. Este gel constituye una matriz o trama tridimensional de fibras poliméricas, embebida en gran cantidad de medio líquido, que retarda el paso de las moléculas de ácidos nucleicos, en mayor medida cuanto más grande sean éstas.

Cuando se prepara el gel en un molde adecuado, se dejan unos huecos o pocillos para poder introducir en las muestras.

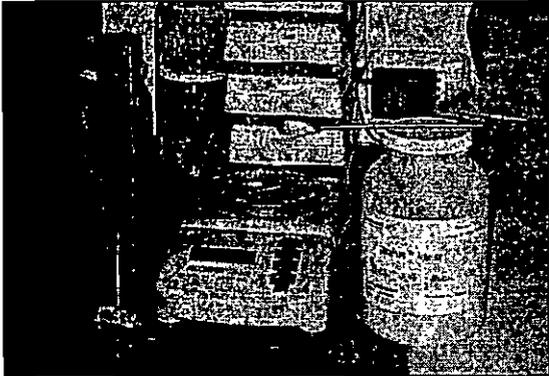
Materiales:

Cámara de electroforesis
Fuente de poder
Horno Micronda
Matraz
Guantes latex
Cinta Masking
Tampón de carga 6X

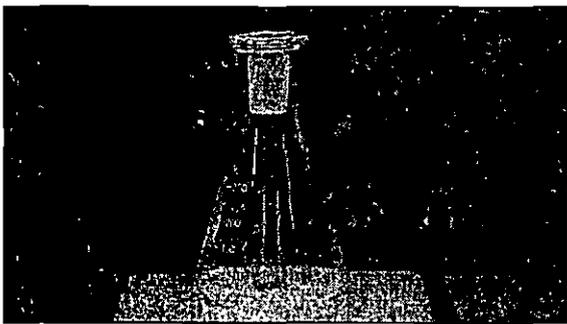
Agarosa
Tampón TBE 0,5x
Probeta
Balanza
Toalla Nova.
Muestras de ADN (PCR)
Transiluminador

Preparación del gel:

1. Seleccionar una cámara de electroforesis y verificar que contenga una ficha informativa con el volumen del molde del gel.
2. Pesar una cantidad en gr de agarosa correspondientes a un 1,5 % del volumen del molde del gel e introducirlos en el matraz.



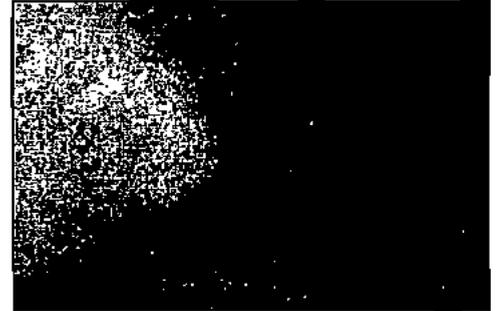
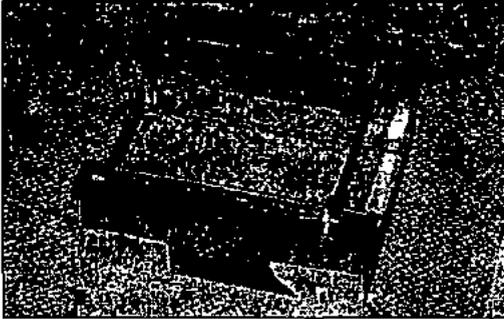
3. Agregar una cantidad mL de buffer TBE 0,5x correspondientes al volumen del molde del gel y agitar suavemente hasta obtener una suspensión homogénea.



4. Calentar el matraz en microondas durante 3 a 4 minutos, hasta que la agarosa se disuelva y se ponga translúcida.



5. Esperar que se enfríe hasta que pueda sostenerse con la mano. En ese momento agregar 5 μ L de bromuro de etidio (este producto es peligroso ya que tiene propiedades cancerígenas por lo tanto es importante usar guantes para manipularlo).
6. Montar las peinetas en el molde para formar los pocillos y vaciar suavemente el preparado en la cama (o molde) evitando que se formen burbujas.



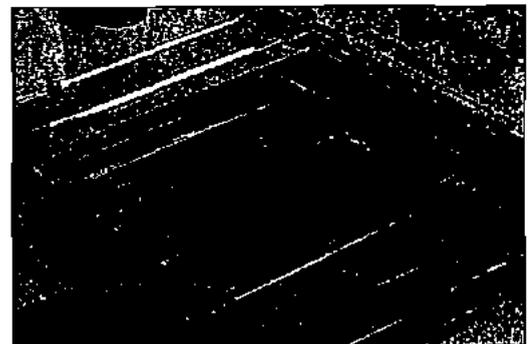
7. Dejar enfriar el gel a temperatura ambiente durante ½ hora.
8. Llenar las cámaras de electroforesis con buffer TBE 0,5x.
9. Retirar las peinetas lentamente del gel y luego introducir el gel con el respectivo molde, en la cámara de electroforesis dejándolo sumergido en el tampón.

Condiciones de electroforesis:

10. A cada una de las muestras de ADN que serán proporcionadas, agregar 2 μ L de tampón de carga (color azul).



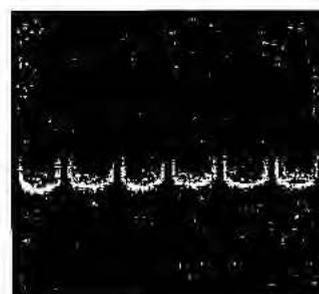
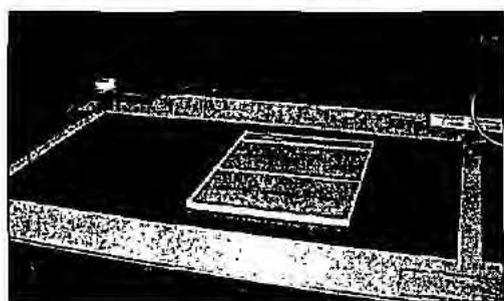
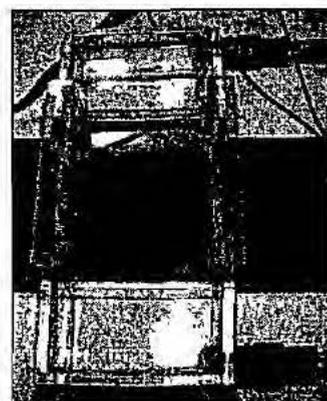
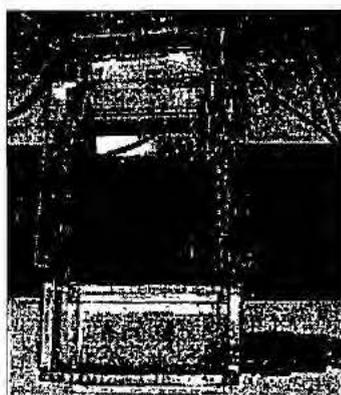
11. Con una pipeta, recoger la solución de ADN más el buffer de carga y proceder a cargar el gel, introduciendo suavemente la punta de la pipeta en los pocillos del gel.



12. Encender la fuente de poder colocando el voltaje en 90 Volt para iniciar la electroforesis.

Nota: Cuide que el cátodo (cable negro) sea el más cercano de los pocillos.

13. Correr la electroforesis por al menos 1 hora y visualizar el ADN (genómico o amplificado por PCR) en un transiluminador.



4. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica ampliamente utilizada en genética vegetal y animal, para amplificar una secuencia específica de ADN.

Una reacción de amplificación PCR requiere de: el ADN molde que contiene la secuencia de interés (puede ser en cantidades muy bajas, incluso una sola copia), dos partidores u oligonucleótidos de ADN de cadena simple que flanquean la secuencia de interés, desoxirribonucleótidos (los componentes del ADN, y la *Taq* polimerasa. La reacción se realiza en ciclos de tres temperaturas para facilitar la copia de nuevos fragmentos de ADN que contienen la secuencia deseada.

A 95°C, la doble hebra de ADN molde se separa (desnaturaliza) en dos hebras simples. Luego, entre 55°C y 65° (esta temperatura depende de la secuencia de cada partidor), los partidores se unen a las secuencias complementarias en el ADN molde. Por último, a 72°C, la *Taq* ADN polimerasa agrega desoxirribonucleótidos en la secuencia que sigue al sector donde se unió el partidor, construyendo la hebra complementaria al ADN molde. Este ciclo se repite hasta que se obtiene un gran número de copias. La reacción se lleva a cabo en un termociclador que cambia rápidamente la temperatura de la mezcla de la reacción entre las tres temperaturas necesarias.

Materiales:

Micropipetas	Puntas para pipetas	Taq ADN polimerasa
Tubos 0,2 ml	Desoxirribonucleótidos (dNTP)	Tampón de PCR 10 x
Gradillas para muestras	Partidores	Cloruro de magnesio 50 mM
Vortex	Muestra de ADN molde	

1. Mezcla de Amplificación.

Para realizar la reacción de amplificación, se deben mezclar en tubos de PCR los siguientes componentes en las cantidades indicadas. En su caso particular Ud. preparará 5 muestras de PCR utilizando los volúmenes indicados en la columna X5.

	X1	X5
H ₂ O	3,52	17,6 µL
Tampón PCR	1,5	7,5
MgCl ₂	0,6	3,0
dNTP	0,2	1,0
Partidor 1	2,5	12,5
Partidor 2	2,5	12,5
Taq	0,2	1,0
ADN	4,0	20,0
TOTAL	15,2 µL	76 µL



2. Una vez completadas la mezcla de PCR, estas deben ser llevada a un termociclador, equipo que esta programado para elevar y disminuir la temperatura permitiendo la amplificación del fragmento de ADN que Ud. desea copiar o amplificar. El programa de temperaturas estándar utilizado en esta demostración se muestra abajo.

Programa de temperaturas del Termociclador.

- 94°C x 2 min.
 - 94°C x 1 min. 30 seg.
 - 60°C x 1 min.30 seg
 - 72°C x 2 min.
 - Repetir pasos b) hasta d) 29 veces
 - 72°C x 5 min.
 - 15 °C de término
3. Una vez colocado los tubos con las mezclas de PCR en el termociclador, el equipo es encendido y se debe esperar entre dos a tres horas para que se complete la reacción de PCR.
4. Finalmente las muestras de PCR son sometidas a electroforesis horizontal en gel de agarosa para visualizar los productos (ADN) amplificado por el PCR.

Material Complementario

Clase Teórica

Jueves 19 de Enero de 2006

“MARCADORES MOLECULARES”

Profesora: MARINA GAMBARELLA

APUNTES COMPLEMENTARIOS
MARCADORES MOLECULARES

Marina Gambardella C.

Con diferentes objetivos, los genetistas requieren de una metodología eficiente para identificar los individuos de tal forma de permitir estudiar los mecanismos hereditarios involucrados en los caracteres de interés. Como ya vimos, la evolución, así como los cambios producidos por el mejoramiento genético sólo son posibles si existe variación, y esa variación debe ser de base genética. Por lo tanto los estudios genéticos están muchas veces orientados a determinar la variación existente en las poblaciones y a entender cómo se trasmite de generación en generación.

Normalmente se han utilizado los parámetros morfológicos para caracterizar los individuos. En el caso de las especies vegetales por ejemplo, el esquema de clasificación se ha basado históricamente en la descripción morfológica. La botánica clásica se fundamenta en la clasificación de las características morfológicas, específicamente de las estructuras reproductivas de las especies: tipo de flor (compuesta, simple, en racimo) número de pétalos, posición de éstos últimos, color, tipo de estambres, número, etc.. Otras características tienen que ver con el hábito de las plantas, si son herbáceas, leñosas, leñosas arbóreas o arbustivas. Hay muchas de estas características que son estables para cada una de las especies, sin embargo existe un amplio conjunto de caracteres variables al interior de las especies.

Desde el punto de vista más agronómico, los mejoradores normalmente ponen su atención en parámetros tales como, tamaño, forma y color de fruto, número de frutos por planta. En el caso de trigo por ejemplo, número de espiguillas por espiga, etc.

Los parámetros morfológicos sin embargo, presentan una serie de limitaciones. En primer lugar, su clasificación y caracterización normalmente implica una gran cantidad de trabajo minucioso, ya que en la mayoría de los casos se debe caracterizar planta por planta en grandes poblaciones. Por otra parte, muchas veces no son fáciles de medir y es necesario recurrir a métodos subjetivos de clasificación, como son la intensidad del color, el sabor, entre otros. Otra limitación está dada por el hecho que gran parte de los caracteres se pueden medir sólo cuando el individuo alcanza el estado adulto, y por lo tanto muchas veces es necesario esperar un largo período de tiempo para establecer el fenotipo de ese individuo. Esto también ocurre en animales, por ejemplo si yo quiero saber si una vaquilla es buena productora de leche, tendrá que esperar hasta su parición para poder determinar su fenotipo.

En este contexto, los marcadores moleculares se presentan como una alternativa para la identificación y caracterización de los individuos, cuya aplicación es posible en

cualquier estado de desarrollo de los individuos sin presentar variación. Dado que la información genética de un individuo es única y se encuentra en el núcleo de todas sus células, normalmente es posible analizar cualquier parte u órgano, ya sea de la planta o de organismos animales. Tiene la ventaja que es posible analizar una gran cantidad de individuos al mismo tiempo con una notable reducción de tiempo, trabajo y espacio. Y por último, constituye una caracterización objetiva.

El dogma central de la herencia, establece básicamente que un gen determina una enzima, y ésta a su vez es la responsable de un determinado fenotipo.

Isoenzimas:

Inicialmente, a partir de la década de los 60, los genetistas pensaron que una forma de estudiar mejor las características genéticas de un individuo, es utilizando el producto primario de los genes, es decir las enzimas o proteínas.

Es necesario saber que las enzimas están constituidas por una familia de moléculas que tienen en común la función de catalizar una reacción específica en el metabolismo de los seres vivos. Esta familia de moléculas o isoenzimas difieren en el tamaño y en su carga eléctrica, permitiendo separar las moléculas a través de un proceso denominado electroforesis. Este consiste en someter las muestras que contienen las enzimas (ya sea sangre o extracto crudo de tejido vegetal) a pasar a través de una matriz porosa sometida a un gradiente eléctrico.

Para la confección de la matriz porosa se pueden utilizar diferentes elementos, por ejemplo, almidón, agarosa, celulosa o acrilamida. Depende del tipo de marcador con el cual se está trabajando, se usará uno u otro elemento para la realización de la matriz. En el caso de las isoenzimas, normalmente se utiliza almidón, por su bajo costo e inocuidad. La matriz porosa debe tener una porosidad uniforme y no debe tener actividad enzimática, es decir debe ser inerte. Esta se prepara de acuerdo a protocolos establecidos y dependiendo de la especie con la cual se está trabajando. Normalmente la concentración del almidón permite variar la porosidad de la matriz que tendrá la función de un verdadero tamiz molecular. Mientras mas grande la molécula (o la enzima) más dificultad tendrá en moverse a través de esta matriz.

En forma muy simple, el análisis isoenzimático consiste en preparar las muestras a partir de hojas, raíces o yemas u otro tejido de la planta (en el caso de animales puede ser sangre), se realiza un macerado a través del cual se obtiene el extracto crudo de tejido vegetal. Se tendrán tantas muestras como individuos que constituyen la población en estudio. Posteriormente se usa un trozo de papel secante el cual se embebe del extracto de tejido y se coloca en contacto con la matriz porosa, la cual se conecta a un alimentador de energía eléctrica y se aplica un gradiente eléctrico. Las enzimas que normalmente tienen carga negativa se moverán hacia el polo positivo, y lo harán a una velocidad dependiente de su tamaño y de su carga. Por lo tanto, después de un determinado lapso de tiempo (entre una y tres horas) lo que se tendrá, son moléculas que han migrado a diferentes distancias del origen. La ordenación particular de las isoenzimas en el gel, visualizadas como bandas,

se denomina zimogramas. Las bandas se ubican en distintas posiciones en el gel debido a sus diferencias en la velocidad de migración en el sistema de matriz porosa y gradiente eléctrico. La visualización de las bandas es posible gracias a un sistema de coloración enzimática altamente específico, el cual se basa en proporcionar los substratos necesarios para que se realice la reacción catalizada por la enzima en estudio, y el producto de esta reacción se acople a un compuesto colorante que precipita y se hace visible en el gel.

El análisis isoenzimático ha sido ampliamente utilizado por los genetistas para caracterizar la variabilidad en poblaciones naturales, en colecciones varietales y como herramienta de identificación varietal, entre otras aplicaciones.

Esta es una técnica relativamente barata y de fácil aplicación. Además es posible analizar varios locus isoenzimáticos en forma rápida y simultánea. Por ejemplo, el sistema de detección por electroforesis en gel de almidón permite cortar un gel longitudinalmente hasta seis delgadas capas. Por lo tanto, en un mismo procedimiento es posible analizar 6 sistemas isoenzimáticos.

Los alelos isoenzimáticos generalmente son codominantes, es decir, es posible distinguir los individuos homocigotos de los heterocigotos. Por este motivo se pueden estimar directamente parámetros tales como frecuencia genotípica, frecuencias alélicas, coeficientes de diversidad genética y heterocigosis.

Cuando la investigación requiere una cobertura más amplia del genoma, como es en el caso de mapeo genético o caracterización detallada del germoplasma, las isoenzimas presentan dos limitaciones básicas:

- a) Se puede detectar sólo un reducido número de locus (tantos como enzimas disponibles, con su sistema de coloración específico).
- b) En general se presenta un limitado número de alelos por locus, es decir un escaso nivel de polimorfismo genético detectable en cada locus.

En los últimos años se han desarrollado una nueva familia de marcadores, destinados a caracterizar directamente el genoma mediante la identificación de polimorfismos a nivel de la molécula de ADN. Para ello lo primero es aislar el ADN.

Marcadores moleculares de ADN.

Los RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism), o Fragmentos Polimórficos de Restricción, fueron los primeros marcadores moleculares basados en polimorfismo de la molécula de ADN y ampliamente utilizados para diversas aplicaciones. Son aquellos originados por la fragmentación del ADN a través del uso de enzimas de restricción y observado por la hibridación de estos fragmentos con una sonda homóloga de ADN marcada con radioactividad o por compuestos que desencadenan una reacción de fluorescencia. Para que el polimorfismo sea detectado, es necesario que las secuencias de nucleótidos en las hebras de ADN de dos o más individuos en estudio, sean distintas. Como las diferencias en las secuencias de nucleótidos a lo largo de las hebras de ADN de

diferentes individuos es potencialmente muy grande, la detección de estas diferencias abre perspectivas muy importantes para estudios del genoma, naturalmente con implicaciones en diversas áreas de la genética. Como veremos, la técnica de RFLP corresponde a un procedimiento que permite detectar muy bien estas diferencias.

Los RFLP constituyen uno de los tipos de marcadores más ampliamente utilizados en genética de mejoramiento de plantas. Sin embargo esta situación ha cambiado en los últimos años con el desarrollo de los marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que veremos más adelante.

El polimorfismo observado en la técnica de RFLP ocurre porque el DNA de individuos genéticamente distintos difiere en la secuencia de nucleótidos a lo largo de sus hebras.

Si por ejemplo, se toma el ADN de dos individuos distintos y éste se somete a digestión por enzimas de restricción, el ADN de ambos individuos se corta en múltiples fragmentos de diferentes tamaños según el número de sitios de restricción presentes en las secuencias de cada genoma. Los fragmentos de ADN así obtenidos son separados por tamaño y a través de electroforesis en geles de agarosa. Las diferencias de tamaños de los fragmentos no pueden ser visualizadas directamente en el gel, ya que se produce un arrastre continuo de fragmentos sobre el gel. Por lo tanto, para realizar la detección de los fragmentos RFLP, estos son transferidos a una membrana de nitrocelulosa por capilaridad, proceso que es denominado Southern blot.

Comparado con las isoenzimas, los marcadores RFLP representan ventajas ya que potencialmente es posible cubrir todo el genoma del organismo estudiado, dependiendo de la biblioteca de las sondas disponibles. El uso de RFLP por lo tanto aumenta las probabilidades de encontrar asociaciones estadísticas entre marcadores y genes que controlan una característica de interés. Así como las isoenzimas, los marcadores RFLP permiten la visualización de genotipos homocigotas y heterocigotas, generando más información a nivel genético. A diferencia de las isoenzimas, estos marcadores permiten detectar diferencias de regiones transcritas y de regiones no transcritas. Otra ventaja de los marcadores basados en el ADN, es que éste una vez extraído se puede conservar por largos períodos de tiempo y es altamente estable.

Una de las desventajas de esta técnica es que se necesita un proceso intensivo en mano de obra y el mejoramiento genético requiere normalmente el estudio de una gran cantidad de muestras, lo cual hace que este tipo de marcadores sean muy costosos.

Marcadores basados en locus hipervariables. Una gran proporción del genoma de organismos eucariontes está constituida por secuencias repetidas de ADN. Por ejemplo, se ha determinado que en *Drosophila*, aproximadamente el 30% del ADN es repetitivo. En tabaco, el 70% y en arroz el 50%. Por este motivo las secuencias repetidas nos permiten mostrar simultáneamente un gran número de locus polimórficos, dispersos en genoma.

Un locus hipervariable, está constituido, de un número variable de secuencias idénticas de 15 a 100 pares de bases y en cada locus se repiten hasta 50 veces.

La base genética de los marcadores minisatélites es muy similar a la base genética de los RFLP, la diferencia está en la sonda utilizada. A diferencia de los RFLP, se obtiene un patrón de bandas más complejo ya que, se evidencian todas las regiones en las cuales están presentes las secuencias hipervariables. Muchas sondas pueden ser usadas en un amplio espectro de especies.

Marcadores basados en PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR fue introducida como herramienta esencial en investigación básica hace cerca de 10 años. La PCR fue inventada en 1985 por Kary Mullis, lo que lo llevó a obtener el premio Nobel de Química en el año 1993. Desde entonces un gran número de publicaciones, que se incrementa anualmente, ha ido adaptando la PCR a un rango de aplicaciones especiales desde la caracterización de genes, su clonamiento y expresión, al diagnóstico del ADN, en que el PCR se usa en la detección de patógenos, identificación de mutaciones responsables de enfermedades hereditarias, aplicaciones médicas y forenses, etc. En virtud de su rapidez, sensibilidad y simplicidad inherentes se ha convertido en el método de elección de muchos laboratorios. Existen muchos textos guías dedicados a los aspectos práctico de la técnica, los cuales contienen protocolos detallados para cada aplicación especial de la PCR, por lo que este apéndice del Manual sólo intenta concentrarse en aspectos pertinentes a los experimentos a desarrollar en el curso.

¿Qué es la PCR? La PCR es una técnica que permite la aplicación *in vitro* de una región específica del DNA que esta delimitada por dos regiones de secuencia conocida. El DNA en su estado nativo existe como una doble hélice con dos hebras de DNA complementarias, corriendo en forma antiparalela y sostenida por enlaces de hidrógeno no covalentes establecidos entre las bases complementarias A-T y G-C. Cada base está unida a una molécula de azúcar, la desoxiribosa, y cada molécula de azúcar esta enlazada a la molécula de azúcar adyacente mediante un grupo fosfato. Así la "unidad" de DNA está comprendida por un grupo fosfato, un azúcar y una base, lo que se denomina **nucleótido**. La amplificación de DNA por PCR se lleva a cabo usando oligonucleótidos partidores ("primers"), que son moléculas cortadas de DNA de hebra simple complementarios a los extremos de una secuencia definida del DNA templado. Los partidores para PCR, sintetizados químicamente, son extendidos desde 5' a 3' sobre la hebra simple del **DNA molde desnaturado**, mediante una **DNA polimerasa**, en condiciones de reacción adecuadas. Esto da como resultado la síntesis de nuevas hebras de DNA complementarias a las hebras del molde. Estas hebras forman nuevas moléculas de DNA de doble hebra. La síntesis de las hebras puede ser repetida solo después de que el DNA de doble hebra se vuelva a desnaturar por calor, se apareen los partidores al enfriar la mezcla y se extiendan estos partidores mediante la DNA polimerasa a una temperatura adecuada para la reacción enzimática. Por lo tanto, cada repetición de la síntesis de una hebra debe entenderse como un ciclo de amplificación, de manera que la secuencia amplificada del DNA blanco es amplificada selectiva y específicamente ciclo tras ciclo. La figura 1 muestra los primeros ciclos de amplificación en que se advierte que los productos de la primera y segunda

extensión tienden longitudes indeterminadas que dependen de la procesividad de la DNA polimerasa, la cual continua la síntesis hasta que simplemente se detiene o es interrumpida por el comienzo del próximo ciclo. Recién a partir del tercer ciclo los fragmentos de la secuencia blanco son sintetizados del tamaño correspondiente a la longitud definida por la posición de los partidores sobre el molde original. Desde el cuarto ciclo en adelante la secuencia blanco es amplificada exponencialmente. Así el número final de copias de la secuencia blanco se puede calcular mediante la formula $(2^n - 2n)x$, donde:

n = número de ciclos;

$2n$ = primer producto obtenido después del 1 ciclo y productos obtenidos después del ciclo 2 con longitudes indefinidas.

x = número de copias del molde original.

Después de 20 ciclos de PCR y suponiendo un 100% de eficiencia durante cada ciclo, el número de copias de la secuencia blanco contendrá las secuencias de los oligonucleótidos en sus extremos. Todo lo anterior es teórico, ya que un **gran número de factores** actúa en contra de una amplificación eficiente en cada ciclo, siendo sus efectos más pronunciados en programas de muchos ciclos de PCR. Por ejemplo, se debe considerar que la cantidad de enzimas llega a ser limitante después de 25-30 ciclos (amplificación de cerca de 10 veces de la secuencia blanco), lo que se debe a que la enzima no da abasto para el exceso de moléculas blanco. La actividad enzimática también llega a ser limitante debido a la paulatina desnaturalización térmica de la enzima durante el proceso. Otro factor que afecta el rendimiento es el reapareamiento de las hebras blanco cuando su concentración aumenta, lo que compete con el apareamiento de los partidores. En fin, la PCR no es la panacea y por lo tanto, es muy importante minimizar y controlar el efecto de todas las variables en el procedimiento PCR y obtener ciclos con alta eficiencia. No cabe la menor duda de que aún es una técnica en desarrollo en muchos campos de la investigación científica.

RADP. (Random Amplified Polimorphic DNA)

Una de las derivaciones a la tecnología del PCR fue el RAPD, este permite la amplificación simultanea de varios locus del genoma, utilizando una secuencias arbitrarias. Uno de los avances de estos marcadores moleculares fue la posibilidad de detectar fragmentos de ADN directamente en un gel de agarosa (debido a las grandes cantidades de ADN que se producen) y gracias a un colorante específico para ADN (bromuro de etidio) Williams et al (1990)

AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism)

Otra derivación de la tecnica de PCR son los AFLP que combinan la especificidad de los RFLP, usando enzimas de restricción y la velocidad de la técnica PCR.

Estos marcadores consisten básicamente en cuatro etapas:

1ª etapa: el DNA genómico total es digerido por dos enzimas de restricción.

2ª etapa: adaptadores específicos son ligados a los fragmentos generados por la digestión o corte con enzimas.

3ª etapa: una fracción de los fragmentos es amplificada selectivamente vía PCR, utilizando primer específicamente diseñados para reconocer secuencias de los adaptadores.

4ª etapa: los fragmentos amplificadores son reparados en geles de alta resolución.

La etapa de corte con enzimas de restricción, se hace con dos tipos de enzimas. Una de corte raro combinado con una de corte frecuente.

Primero se hace la digestión con la enzima de corte raro y luego con la de corte frecuente. De esta forma se logra tres tipos de fragmentos.

- 1) Fragmentos grandes resultantes del corte con enzimas de corte raro en ambas extremidades.
- 2) Fragmentos pequeños resultantes del corte con enzimas de corte frecuente en ambas extremidades.
- 3) Fragmentos de tamaños intermedios resultantes de cortes con enzimas rara y frecuente

Los partidores diseñados para amplificar los segmentos utilizan las secuencias de los adaptadores más uno a dos nucleótidos adicionales de secuencia arbitraria en su extremidad 3'. Por lo tanto la amplificación se producirá sólo en aquellos fragmentos que adicionalmente al adaptador, tengan los nucleótidos adicionales.

VENTAJAS

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Cubren parcialmente todo el genoma de los organismos en estudiado, dependiendo del tipo de biblioteca de sondas utilizadas. El uso de este tipo de marcador aumenta la probabilidad de encontrar asociaciones estadísticamente significativas entre marcadores o genes que controlan un carácter de interés.

Minisatélites

Los minisatélites han sido usados para estudiar diversidad genética y realizar la identificación de individuos (fingerprinting) en diversas especies. Al igual que en RFLP, la técnica es de alta reproducibilidad, aunque requiere de un proceso de clonación previo de la sonda hipervariable. Además, se requiere de un ADN de alta calidad para el proceso de restricción y transferencia (Southern Blot) e hibridación con la sonda, generalmente marcada radioactivamente. Este polimorfismo identifica un *locus* que resulta ser multialélico debido a un elevado número de unidades repetidas que corresponden a muchos alelos.

SSR (Simple Sequence Repeats)

Son los que poseen una mayor información de polimorfismo. Los marcadores basados en microsatélites están siendo utilizados actualmente en la elaboración de mapas genéticos y físicos, estudios de ligamiento, identificación y discriminación de genotipos así como en estudios de genética de poblaciones. Este tipo de marcador presenta la ventaja de que al ser codominante y multialélico son los que poseen el más elevado polimorfismo, son muy frecuentes y se encuentran distribuidos al azar en el genoma

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Son de gran simplicidad y rápidos. No requiere el desarrollo previo de una biblioteca de sondas específicas para el organismo de interés. Se utiliza un conjunto único de primers

arbitrarios independientemente del organismo en estudio. No se utilizan isótopos radioactivos. Se emplea una cantidad mínima de ADN, necesaria para el análisis genotípico de los individuos. Por basarse en la técnica de PCR, la técnica RAPD es mucho más sensible en la detección de polimorfismo a nivel de ADN. Permite muestrear regiones de ADN repetido, ya que los primers que se utilizan para detectar variaciones a nivel de ADN, son arbitrarios

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Presenta la ventaja de obtener un elevado número de polimorfismo, gran poder de detección de variabilidad genética, no requiere de un conocimiento genético previo del organismo o especie a estudiar. Además presenta mayor robustez la cual se debe básicamente a que se utilizan primers más largos en el PCR lo que aumenta significativamente la especificidad de la amplificación evitando la competencia de los sitios de amplificación y requiere muy poca cantidad de ADN genómico. Es una técnica para "fingerprinting" de ADN genómico, utilizada con el fin de visualizar polimorfismo de ADN entre las diferentes muestras de un germoplasma, para generar mapas de ligamiento o para identificar marcadores moleculares unidos a caracteres fenotípicos y/o locis genéticos.

Característica	RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	Minisatélite VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)	Microsatélite o SSR (Simple Sequence Repeats)	RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)
Principio	Digestión con enzimas de restricción, Southern Blot e hibridación	Digestión con enzimas de restricción, Southern Blot e hibridación	Amplificación por PCR de secuencias repetidas simples	PCR con partidores arbitrarios
Tipo de polimorfismo	Cambio de bases en sitios de restricción, inserciones y deleciones	Cambio de bases inserciones y deleciones	Diferencias en longitud debido a número de unidades repetidas	Cambio de bases en sitios de unión del partidor al templado inserciones y deleciones
Polimorfismo	Moderado	Bajo	Alto	Moderado/bajo
No. Loci detectados	1 a 3	Muchos	1	1 a 10
Dominancia	Codominante	Dominante	Codominante	Dominante
Información requerida	Ninguna	Ninguna	Si	No
Dificultad técnica	Intermedia	Intermedia	Baja	Intermedia
Costo de desarrollo	Intermedio	Intermedio	alto	bajo

PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN.

En la literatura se han descrito varios procedimientos de extracción de ADN y difieren en general sólo en algunas modificaciones para resolver algún problema específico de la especie en estudio.

1. Identificación y colecta del material fresco.
2. Pesado del tejido vegetal. El peso de la muestra dependerá del contenido de agua del tejido y además si se trata de una macro extracción (en tubos de ensayo) o de una micro extracción (en tubos eppendorf).
3. Maceración. Puede realizarse en presencia de nitrógeno líquido, a través del efecto abrasivo de arena o bien con un molino eléctrico si el tejido está liofilizado. La maceración tiene como objetivo romper las paredes y membranas celulares del tejido.
4. Adición del tampón de extracción. Este compuesto contiene:
 - CTAB, detergente catiónico que permite la solubilización de las membranas celulares. Además ayuda en la posterior precipitación del ADN.
 - PVP (Polyvinylpyrrolidona), reduce el efecto oxidante de compuestos fenólicos como taninos, quinonas y polifenoles.

- EDTA para inhibir enzimas ADNas
- 2-mercaptoetanol que protege al ADN de enzimas peroxidasas y polifenoloxidasas
- Otros compuestos para estabilizar el pH.

En definitiva, el agente tamponante tiene como finalidad solubilizar las membranas lipoproteicas y desnaturalizar las proteínas preservando el ADN de la acción de enzimas de degradación.

5. Solubilización y homogeneización. Se incuban las muestras a 65°C durante 30 a 60 minutos, agitando periódicamente cada 10 ó 15 minutos para asegurar la acción del tampón de extracción sobre el macerado.
6. Separación de fases. Se adiciona cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y luego se somete a centrifugación. En los tubos se observarán claramente dos fases separadas por una membrana:
 - Fase orgánica en la parte inferior, compuesta por lípidos, proteínas y polisacáridos.
 - Fase acuosa en la parte superior, donde quedan retenidos el ADN, el ARN y algunos polisacáridos contaminantes. Esta fase es "rescatada" con una micropipeta.
7. Precipitación del ADN. Se adiciona alcohol (etanol o isopropanol) y sal (NaCl) y luego se centrifuga para formar un precipitado o pellet de ADN/ARN. Se elimina el contenido líquido para aislar los ácidos nucleicos que luego son lavados con alcohol.
8. Finalmente, el precipitado limpio de ADN/ARN es resuspendido en una solución tampón que contiene ARNasa para degradar el ARN presente.

MEJORAMIENTO GENÉTICO EN ESPECIES VEGETALES

Marina Gambardella C.

Fundación para la Innovación Agraria
Coordinadora Programa de Biotecnología
Directora REDBIO/CHILE

Esta es una actividad que está muy ligada a la biotecnología, y por lo tanto es importante entender las bases sobre las cuales se sustenta el mejoramiento genético de especies vegetales y tener una primer aproximación a un esquema general de mejoramiento clásico, y cómo este se modifica o complementa con herramientas biotecnológicas. Es importante mencionar que uno de los objetivos de este curso es proporcionar un lenguaje que permita posteriormente introducirse en el tema de la biotecnología, sin demasiada dificultad.

La siguiente reflexión no siempre es considerada o entendida por el público general: "La mayoría de las especies vegetales actualmente utilizadas por el hombre, ya sea para su consumo directo o bien para uso industrial, como fibra, madera, etc., ha sido modificado genéticamente por el hombre".

Cuando nos sentamos a la mesa a comer por ejemplo un maíz, o una zanahoria, o un tomate, etc., probablemente no nos imaginamos que detrás de cada uno de estos productos ha existido una "manipulación genética" realizada por el hombre. Esta "manipulación" consiste en cambiar o modificar la estructura genética de la especie que nosotros deseamos utilizar a través del mejoramiento genético, que es el tema que analizaremos hoy. Este proceso de cambio de la estructura genética de las especies se inicia en la prehistoria, cuando el hombre comienza a realizar agricultura. Corresponde a un proceso gradual y acumulativo en el tiempo.

El proceso de transformar una especie silvestre en una especie útil para los objetivos del hombre se conoce como **domesticación**.

¿Cuál es el punto de partida? Para cada especie, se ha determinado que existe una región o área geográfica de dónde son originarias. Éstas corresponden a los denominados **centros de origen**.

El ruso Vavilov, luego de estudiar la enorme cantidad de material vegetal recolectado en el Instituto que dirigió desde 1916, lo llevó a determinar que la gran mayoría de la riqueza varietal de nuestras plantas cultivadas, se concentra en ocho grandes centros de dispersión o centros de origen. Estos son: China, Asia Central, Asia Menor, La región Mediterránea, Abisinia, América Central y la región centro occidental de América del Sur.

Algunos ejemplos:

Maíz	América tropical
Algodón	América del norte tropical
Trigo	Asia menor
Tabaco	América tropical
Avena	Asia Menor y norte de África
Soya	China
Papas	América del sur
Cebada	Asia Menor
Tomates	América tropical

Se ha establecido que en el centro de origen de una determinada especie, es decir la región en la cual se inició el proceso de domesticación, es posible encontrar un alto grado de **variabilidad genética** para esa especie, y un elevado número de especies afines (aquellas que se encuentran cercanas en la línea evolutiva y que posiblemente pueden intercambiar genes a través de cruzamientos espontáneos).

La domesticación de las plantas es el primer paso del proceso que nosotros conocemos como mejoramiento o mejora genética, también denominada mejoramiento varietal.

¿En qué consiste este proceso?

Ya que vimos que existen notables diferencias entre el material original y el material que nosotros habitualmente usamos, ya sea en la mesa o para otros propósitos, podremos imaginar que el proceso de "transformación" es complejo y lento.

Se dice que los programas de mejoramiento normalmente constituye la columna vertebral de la investigación en una especie, en la cual confluye el conocimiento de diferentes áreas de las ciencias asociadas a la agronomía (genética, bioquímica, patología vegetal, física química fitotecnia, entre otras). Esto quiere decir que los resultados de toda la investigación que se realiza en estas áreas por una determinada especie, finalmente se traducen en una modificación de la variedad que nosotros vamos a obtener. Es importante entender, que sin esta estructura de soporte, que está esquematizada como la columna vertebral, es difícil traducir en un resultado productivo, los descubrimientos realizados en cada una de las áreas mencionadas.

¿Como se inicia un programa de Mejoramiento?

En primer lugar es necesario establecer los objetivos de mejoramiento. Estos objetivos dependen de los requerimientos de los productores, intermediarios, consumidores y agroindustrias en el caso de cultivos que son procesados. El mejorador por lo tanto hace una lista de caracteres que deberán ser modificados para satisfacer las necesidades de cada uno de estos actores. A esta lista de caracteres se le asigna una prioridad, la cual por supuesto que cambia con el tiempo. Por ejemplo, si yo voy a iniciar un proceso de mejora en tomate, voy a pensar, cuáles son las características que me gustaría cambiar:

El consumidor... sabor, color.

El productor rendimiento, resistencia a la enfermedad x.

El Intermediario.....firmeza de pulpa

El agroindustrial densidad de la pulpa, color, etc.

Es decir, nosotros buscaremos una variedad de tomate que idealmente reúna todas las características que hemos definido de nuestro interés. Sin embargo, no siempre es posible obtener todas estas características en un período corto de tiempo. La mayoría de las veces los caracteres de interés están negativamente correlacionados ente si. Por ejemplo, el sabor es inversamente proporcional a la firmeza de fruto, ya que el sabor está fuertemente influenciado por ciertos compuestos volátiles que son producidos por el fruto y que tienden a ablandar la pulpa.

Es necesario entender en este momento, que es Fenotipo y Genotipo.

El **fenotipo** de un individuo, de una planta o de una variedad, se refiere a la suma de características que lo identifican.

Por otra parte el **genotipo**, corresponde al arreglo particular de genes de un determinado individuo, planta o variedad. Es la constitución genética total de un organismo. Dicho de otra manera, el genotipo es la información que se encuentra almacenada en el núcleo de las células de un individuo, específicamente en la molécula de ADN.

El fenotipo, es la expresión del genotipo y de la interacción de este con el medio ambiente. Por ejemplo, el peso de un individuo corresponde al fenotipo en relación a su constitución corpórea, pero aunque existe una componente genética para este resultado que se verifica en la pesa de su casa, también está influenciado por la cantidad de hamburguesas que se come habitualmente, es decir su dieta.

A una planta de maíz se le puede establecer con bastante exactitud, su altura. 2,10m corresponde al fenotipo de esa planta en relación a la altura, pero esta no solo está determinada por los genes que ella posee sino que también por el tipo de suelo en la cual crece, la cantidad de agua que hemos proporcionado y por supuesto la fertilización que se ha aplicado.

Es importante mencionar que existen básicamente dos tipos de caracteres, aquellos cualitativos, para los cuales normalmente existe una variación discreta. Es decir, hay dos o tres alternativas fenotípicas. Algunos ejemplos, color de flor, ausencia o presencia de aristas en las espigas, forma de la hoja, tipo de cloroplasto, semilla rugosa o lisa, etc.. En estos casos, en general la determinación genética se debe a un par de genes.

Un segundo tipo de caracteres, los llamados **cuantitativos**, se refiere a aquellos que presentan una variación continua y normalmente es posible medirlos a través parámetros numéricos (metros, kg, %). Ejemplos, altura de planta, rendimiento, peso corporal al nacer, etc. A diferencia de los primeros, este tipo de caracteres está determinado por muchos genes y tiene una importante influencia del medio ambiente. Estos son los caracteres que normalmente están incluidos en los objetivos de mejoramiento y no siempre son fáciles de modificar. Abriendo un pequeño paréntesis, es necesario decir que la ingeniería genética, nos ha permitido identificar algunos genes, clonarlos y posteriormente introducirlos a las plantas, pero esto no es posible con los caracteres cuantitativos, ya que deberíamos trabajar al mismo tiempo con un gran número de genes, lo cual por ahora no es posible.

Una vez que tenemos los objetivos de mejoramiento, vamos a iniciar nuestro programa, para lo cual debemos contar con una colección de individuos con suficiente variabilidad, para conseguir una combinación de genes que tenga, las características que nosotros hemos predeterminado como favorables. Lógicamente, si nosotros no tenemos variación, no podremos seleccionar, no conseguiremos cambio alguno. Lo que normalmente hacen los mejoradores es implementar una colección de germoplasma. Esta colección normalmente incluye una colección de las variedades comerciales actualmente disponibles. Hay que tener cuidado ya que el sucesivo mejoramiento utilizando los mismos patrones de selección, inevitablemente van produciendo una pérdida de variabilidad, o dicho de otra forma, una homogenización. Es lo que se denomina **erosión genética**. De ahí la importancia de mantener colecciones de germoplasma nativo y de preservar las poblaciones naturales ya que es ahí donde se encuentra buena parte de la variabilidad existente para una determinada especie. Cuando es necesario introducir variabilidad, esto se logra haciendo cruzamiento con plantas silvestres, incluso haciendo cruzamientos interespecíficos. Otra forma de aumentar la variabilidad, es utilizando la inducción de mutaciones. Esta es una práctica

que se utiliza en muchos programas de mejoramiento, pero que evidentemente es algo drástica y peligrosa. Además es importante entender que las mutaciones que nosotros vamos a obtener no tienen dirección, no es posible decir voy a irradiar para tener un mutante con flor blanca, por ejemplo.

Partimos entonces con los objetivos de mejora ya establecidos, y una buena colección de material para iniciar nuestro programa. Ahora debemos diseñar un esquema, una estrategia inteligente que nos permita lograr nuestros objetivos. Existen múltiples posibilidades para los mejoradores, incluso dentro de una misma estrategia, es muy importante la habilidad del mejorador para identificar las plantas que son mejores y que nos conducirán a la obtención de las variedades "plus". Se dice que el mejoramiento genético es un arte, aunque es posible apoyarse en la ciencia, existe una buena parte de incertidumbre en los resultados que se podrán obtener. Otros incluso han dicho que el mejoramiento tradicional es una lotería.

El siguiente aspecto que debe ser considerado, es la biología reproductiva de la especie con la cual estamos trabajando. En forma simplificada, podemos decir que existen tres grandes grupos de especies vegetales.

Plantas de autopolinización, **plantas autóгамas**.
Plantas de polinización abierta, **plantas alógamas**.
Plantas de **reproducción vegetativa**.

Las plantas tienen diferentes mecanismos para asegurar su tipo de reproducción. Por ejemplo, en trigo, la polinización se realiza antes de que la flor abra, y por lo tanto la semilla que se cosecha, es decir el grano de trigo es el producto de la autofecundación.

En maíz, en una misma planta, la parte femenina está separada de la parte masculina y por lo tanto, en la mayoría de los casos la fecundación se produce con el polen que viene de otra planta y que es transportado libremente por el viento. (en algunas especies, la polinización la realizan los insectos).

En la naturaleza, existen algunas especies que se reproducen principalmente en forma vegetativa. Por ejemplo, la frutilla. Es una especie que creciendo en forma silvestre, emite unos estolones, o tallos, en cuya punta existe una yema que se apoya en el suelo y genera una nueva plantita. Esta nueva planta es una copia de la planta madre, o un clon. Esto no quiere decir que la planta no tenga sistema de reproducción sexual, de hecho tiene flores, e igualmente produce semillas, pero coloniza extensas áreas a través de sus estolones.

Sin embargo, una cosa es lo que ocurre en forma natural, y otra es cómo utilizamos normalmente esa especie. Por ejemplo, en la mayoría de los frutales, se utiliza la propagación vegetativa. Por lo tanto el mejoramiento genético que nosotros vamos a realizar debe considerar ambos aspectos, el natural y el normalmente utilizado por el hombre.

También en forma muy simplificada podemos decir que:

En plantas de autopolinización, normalmente vamos a dirigir nuestra estrategia hacia la producción de **líneas puras**. Es decir, obtener variedades que en su constitución genética la mayoría de sus genes estén en estado homocigoto. La consecuencia de esto, es que de generación en generación, las plantas van a mantener su mismo genotipo y por lo tanto sus características fenotípicas también son estables en el tiempo. Ya veremos más adelante que esto tiene gran importancia desde el punto de vista comercial.

En plantas de polinización abierta por el contrario, vamos a dirigir el mejoramiento hacia la obtención de **variedades híbridas**. Las variedades híbridas corresponden a aquellas que en su constitución genética, la mayoría de los genes se encuentran en estado heterocigoto. De esta forma lo que se pretende lograr es aprovechar la expresión del denominado **vigor híbrido**, que corresponde a la respuesta de superioridad frente a la media de los progenitores, cuando se realiza un cruzamiento entre dos individuos genéticamente alejados.

Básicamente, los métodos de mejoramiento tradicional, son los siguientes:

Mejoramiento de plantas autóгамas:

- a) Selección individual
- b) Selección masal
- c) Hibridación con manejo de la descendencia a través de método - Genealógico
 - Masal
 - Retrocruza
 - SSD

Mejoramiento de plantas alógamas:

- a) Hibridación de líneas puras
- b) Selección masal
- c) Retrocruzamiento
- d) Selección recurrente

Reproducción vegetativa:

- a) Cruamientos y selección
- b) Selección de variedades heterogéneas
- d) Mutaciones espontáneas e inducidas

La definición del método que será utilizado, depende de múltiples factores. Como ya se vio, la primera consideración es el tipo de reproducción de la especie. No solo se debe considerar la reproducción utilizada para su cultivo sino que también se deben estudiar los mecanismos reproductivos que la especie utiliza en su estado natural. Por ejemplo, el duraznero es una especie que nosotros normalmente reproducimos en forma vegetativa a través de la injertación con yemas provenientes de un clon. En la región de donde esta especie es originaria, las formas silvestres han evolucionado hacia una autopolinización, principalmente porque crece en áreas muy desérticas y existen pocas probabilidades de que se produzca polinización abierta, y por lo tanto los mecanismos de selección natural (evolución) se han orientado hacia el desarrollo de la autopolinización. La autopolinización ha determinado que existe una alta homocigosis en las plantas de duraznero. Esto, sumado a un intensivo trabajo de mejoramiento realizado por el hombre durante los últimos años, ha redundado en que los bancos de germoplasma actualmente disponibles tienen una limitada viabilidad genética.

Otro ejemplo, es el tomate. Las variedades y formas que hoy son cultivadas tienen un alto porcentaje de autopolinización (aproximadamente el 95%). Sin embargo, las especies silvestres presentan un porcentaje considerablemente mayor de polinización abierta (más de 30%). Es por esto que el tomate en parte se comporta como una especie de polinización abierta y la estrategia que se usa normalmente en mejoramiento está orientada a la obtención de variedades híbridas de tal forma de aprovechar el vigor híbrido.

Además del tipo de reproducción de la especie, se debe considerar si la especie ha sido o no sometida por el hombre a una "manipulación" demasiado intensa. Las especies

que se encuentran en una fase más avanzada del mejoramiento genético, tiene una variabilidad genética menor y por lo tanto se deben aplicar métodos más eficientes en detección e identificación de genotipos favorables. Por el contrario, en las especies que están aún en una fase primaria en el proceso de intervención del hombre, se pueden aplicar los métodos más simples y menos costosos.

Los objetivos de mejoramiento, y por lo tanto la naturaleza de los caracteres que se desean modificar, también influyen en la estrategia de mejoramiento. En términos generales, existen caracteres con alto grado de **heredabilidad** (proporción de la variación total de un carácter, debida a componentes genéticas) con los cuales también es más fácil trabajar ya que el fenotipo representa en una buena proporción el genotipo del individuo.

Existen muchos otros factores, como la disponibilidad de material, aspectos de tipo comercial, recursos disponibles (presupuesto y recursos humanos) etc.

El caso del trigo corresponde a un ejemplo clásico de mejoramiento genético de planta autógama. Para esta especie en la mayoría de los casos se utiliza un esquema de hibridación con manejo de la descendencia según el método genealógico. Como se muestra en el esquema, este consiste en el cruzamiento de dos líneas puras, y se inicia la selección en la F-2, cuando se produce la segregación de los genes contenidos en el heterocigoto de la F-1. Por tres o cuatro generaciones, se procede a realizar selección masal generando campos de selección en cada temporada. En la F-5 o F-6, se inicia el método genealógico que consiste en la selección de una planta y el cultivo de la descendencia en parcelas individuales. De esta forma se va logrando un mayor grado de homocigosis. Cada parcela, aunque ya es bastante homogénea, todavía presenta variación y por lo tanto por tres a cuatro generaciones se continúa el proceso de selección de una planta y el cultivo de la descendencia por separado. En las últimas etapas, se realizan ensayos comparativos con las variedades que se encuentran en el mercado para establecer la superioridad de las nuevas selecciones. Finalmente, los ensayos se extienden a diferentes regiones y se hace al mismo tiempo un incremento del material de reproducción, para finalmente obtener la semilla que será comercializada y distribuida a los agricultores. Este proceso tiene una duración aproximada de 13 a 14 años.

Material Complementario

Viernes 20 de Enero de 2006

Clase Teórica:

“AVANCES EN GENÉTICA HUMANA”

Profesor: MANUEL SANTOS

ENFERMEDADES GENÉTICAS EN PEDIATRÍA

Dr. Manuel Santos A. Dra- Ghislaine Morizon

El nacimiento de un niño potencialmente portador de una enfermedad genética, es habitualmente un evento inesperado, muy angustiante para los padres y la familia. Por esta razón el equipo médico debe estar preparado para hacerse cargo en forma rápida y eficiente del niño y de sus familiares. Un diagnóstico oportuno permitirá por una parte, evaluarla situación, intentar aproximarse a un diagnóstico específico y en lo posible, a una terapia adecuada, y, por otra parte, orientar y dar apoyo a los padres y en caso necesario, entregar un consejo genético apropiado.

I.- INTRODUCCION

1.- Conceptos básicos de genética humana

La Genética Humana es la disciplina biológica que se preocupa de la manera cómo se transmiten (herencia) los caracteres de padres a hijos a lo largo de las generaciones, y de las semejanzas y diferencias entre padres e hijos, que son determinadas por la herencia y el ambiente.

Cada ser humano está formado por trillones de células. En cada una de ellas células existen 46 cromosomas: 44 cromosomas autosómicos y 2 cromosomas sexuales (XX en las mujeres y XY en los varones. Los 46 cromosomas corresponden a 23 aportados por el espermio y 23 aportados por el óvulo, de modo que al ocurrir la fecundación se constituyen los 46 cromosomas del cigoto y de todas las células derivadas del cigoto inicial. En los cromosomas residen los genes, que corresponden a las unidades de la herencia. La información genética se encuentra codificada en pequeños trozos de la molécula de ADN. Los genes poseen una secuencia específica con una función particular. Generalmente, esta secuencia génica específica determina una función específica, como por ejemplo, la formación de una proteína que cumple un rol específico en las complejas vías metabólicas que presentan las diferentes células de nuestro organismo.

Cada cromosoma está formado por una molécula de ADN, por ello, en cada uno de estos cromosomas existen miles de genes. Dado que existen dos versiones para cada cromosoma autosómico específico (un set es aportado por el óvulo materno y el otro por el espermio paterno), también existen dos versiones (diploidía) para cada uno de los genes autosómicos. En el caso de los cromosomas sexuales, los genes del cromosoma X, a pesar de que la mujer posee dos copias de cada uno de los genes presentes en el cromosoma X (genes ligados al X), en la mayoría de los casos sólo se expresa uno de ellos. Por lo tanto mujeres y hombres expresan una sola versión de sus genes ligados al X. Los genes del cromosoma Y, entre ellos, los genes involucrados en la determinación del sexo, sólo se expresan en el hombre. De ahí que en la especie humana el sexo de los hijos se haya determinado por la presencia del cromosoma Y en el cigoto.

Como cada individuo posee parejas de cromosomas autosómicos, en cada miembro de la pareja existirá una versión de cada gen. Por ello, cada individuo posee dos versiones para cada gen autosómico (cada versión se llama alelo). Si las dos versiones son idénticas se habla de individuo homocigoto y si son diferentes se habla de individuo heterocigoto. En una población humana pueden existir más de dos alelos para un mismo locus cromosómico (alelos múltiples), como ocurre con el caso de los antígenos de histocompatibilidad (involucrados en transplante de órganos), que por su elevado número de alelos diferentes (alto polimorfismo), es difícil encontrar dadores compatibles en individuos no emparentados.

Las características observables de un individuo determinados por los genes y el ambiente constituye el fenotipo. El conjunto de genes de un individuo corresponde al genotipo. Actualmente se denomina genoma a la totalidad de DNA de los individuos.

Habitualmente, para que los genes específicos ejerzan su acción determinada se requiere además de su integridad anatómica y funcional, la presencia de un restante genotipo armónico y de un ambiente adecuado. Por ejemplo, un determinado fenotipo producto del gen IA (que determina la aparición del grupo sanguíneo A), puede no producirse si existe otro gen H (localizado en otro sitio del genoma), que al interactuar con el gen Z a nivel de la ruta metabólica específica, impide que aquél ejerza su efecto (resultando en un fenotipo distinto, en este caso grupo sanguíneo O). Por otra parte, existen condiciones ambientales que inciden en que un determinado gen se exprese o no. Por ejemplo, la focomelia (ausencia de extremidades) que puede ser producto de "genes de focomelia", también puede producirse por causas ambientales (en individuos que no poseen los "genes de focomelia", tal como ocurre con la ingesta de talidomida durante el embarazo y que remedia el efecto de genes de focomelia). Estos ejemplos muestran la importancia de la llamada Ecuación fundamental de la Genética: GENOTIPO + AMBIENTE -----> FENOTIPO: Todo fenotipo es el resultado de un genotipo que se expresa en un determinado ambiente y de las interacciones entre ellos.

En general, los rasgos hereditarios humanos más comunes tales como color de ojos, de pelo, forma de pelo, peso, estatura, Coeficiente Intelectual (CI), etc. son rasgos que presentan una variación continua en la población, y de herencia compleja. Ellos poseen una base genética de tipo multifactorial poligénica, de tipo aditivo. Es decir existen varios genes ubicados en distintos cromosomas, con efecto fenotípico de tipo aditivo (esto es, cada poligen aumenta un determinado valor fenotípico sobre un basal) y no discernible individualmente. Además, estos caracteres poseen una fuerte dependencia ambiental, como lo han mostrado los estudios de caracteres humanos poligénicos comparando mellizos monocigóticos (genéticamente idénticos en 100%) v/s mellizos dicigóticos (50 % de genes idénticos) sometidos a diferentes condiciones ambientales.

I.2.- Nuevos aspectos genéticos relacionados con la individualidad del embrión humano

Existe una serie de aspectos genéticos novedosos relacionados con la individualidad del embrión humano y que fundamentan, aún más, el respeto a la vida humana desde el momento mismo de la concepción.

Biológicamente, cuando un espermio fecunda a un óvulo, se constituye un nuevo ser humano. El espermio aporta 23 cromosomas y el óvulo los otros 23 cromosomas, y después de la fecundación, el nuevo ser, llamado técnicamente cigoto contiene los 46 cromosomas característicos de todas las células que constituyen a los seres humanos. Es importante señalar que cuando contactan las membranas de espermios y oocito, se desencadena una serie de eventos que lleva finalmente a la constitución del cigoto. En los pronúcleos masculinos y femeninos ocurre duplicación de los cromosomas (sin fusión de ellos o mal llamada "singamia"), de modo que los cromosomas duplicados se ordenan en el plano ecuatorial y comienza la primera división celular, sin haber existido "singamia". Luego, las 2 células (blastómeros) se dividen en 4 células, y posteriormente en 8 y así sucesivamente, hasta formar el embrión, el feto y finalmente el recién nacido. Ocurre síntesis de proteínas específicas del genoma del embrión ya a las 4 a 6 hrs. después de la fecundación.

Recientemente, se descubrió que los 23 cromosomas aportados por el padre a través del espermio, son genéticamente "distintos" a aquellos 23 cromosomas aportados por la madre. Los cromosomas paternos y maternos poseen una modificación química llamada impronta genética (o "imprinting"). Ello explicaría que para constituir un nuevo ser humano se requiera de

los complementos cromosómicos aportados por ambos padres. También explica que cuando por razones de patología espontánea, el cigoto contiene sólo cromosomas maternos o sólo paternos no haya un desarrollo embrionario adecuado y se termine el embarazo en graves trastornos embrionarios, tales como una mola o un teratocarcinoma. Y finalmente, el "imprinting genómico" explica la imposibilidad biológica de producir hijos a partir de dos padres de un mismo sexo. El "imprinting" cromosómico apoya aún más la individualidad del cigoto y la del embrión humano. Por ello, nadie, ni la madre ni el padre del individuo en gestación, pueden decidir a voluntad acerca del futuro de ese nuevo ser en gestación. Como el gran médico genetista francés Profesor Jerome Lejeune, descubridor de la trisomía 21 del Síndrome de Down, solía afirmar: "el embrión es la más indefensa de todas las criaturas".

I.3.- El Proyecto del Genoma Humano

En los 22 pares de cromosomas autosómicos humanos y en el par sexual X e Y, existen aproximadamente 30.000 genes. Ello constituye el genoma humano. Uno de estos miles de genes es el "gen de la Fibrosis Quística". Este gen corresponde a un trozo de ADN localizado en el cromosoma 7 y cuya secuencia codifica la información para sintetizar una proteína llamada CFTR, necesaria para el transporte de electrólitos en las membranas de células epiteliales, como por ejemplo, en células epiteliales respiratorias. Cuando existe una alteración en la secuencia de este gen, que determine la ausencia de su producto o una anomalía en él, esta alteración producirá una ausencia de la proteína CFTR, con los consiguientes problemas bronquiales y pancreáticos severos, característico de la Fibrosis Quística.

El llamado "Proyecto del genoma Humano" es un proyecto de investigación billonario cuyo propósito es conocer la secuencia de todo el ADN humano (que contiene alrededor de 1 billón de bases nitrogenadas). La identificación de toda la secuencia del genoma humano, permitirá conocer la secuencia de los ~30.000 genes (que constituyen un bajo % (alrededor del 3% de todo el genoma). En Febrero de 2001, se completó la secuencia del genoma humano y ya se conocen alrededor de 12.500 de estos genes. La localización de estos genes a nivel cromosómico es lo que constituye el mapa genético de los cromosomas. La información generada por este Proyecto está disponible en todo momento a través de INTERNET (ver bibliografía). Actualmente, se está realizando mucho esfuerzo en la investigación sobre la identificación y el rol de las proteínas que son productos de los genes (Proyecto Proteoma).

Este Proyecto tiene un profundo impacto a nivel ético, legal y social, por lo que un monto significativo de sus fondos está dedicado a analizar estas implicancias (ELSI). Por ejemplo: acceso a la información de las características genéticas de las personas por parte de las aseguradoras de salud, consecuencias del conocimiento del estado de portador de una enfermedad genética que se desarrollará en el futuro, ideas eugenésicas, etc.

II.- CATEGORIAS DE ENFERMEDADES GENÉTICAS

II.1.- Concepto

Las enfermedades genéticas corresponden a un grupo heterogéneo de afecciones que en su etiología presentan un significativo componente genético. Ello puede ser alguna alteración en un solo gen, en varios genes (poligenes) o en muchos genes (cromosomas). La alteración genética puede producir directamente la enfermedad (por ejemplo, el caso de la Hemofilia) o interactuar con factores ambientales (como por ejemplo, la predisposición genética en la etiología de la Hipertensión arterial). Cada vez se hace más difícil separar las afecciones de etiología ambiental de aquellas llamadas "genéticas puras". A modo de ejemplo, conviene recordar

que para varias enfermedades típicamente ambientales, como infecciones bacterianas, parasitarias, etc, recientemente se ha demostrado una susceptibilidad genética individual.

II.2.- Importancia de las enfermedades genéticas en Salud Pública

Se estima que aproximadamente el 3-7% de la población presenta un problema genético. En estos últimos tiempos la disminución de ciertas enfermedades como las infecciosas ha puesto de relieve la importancia de las enfermedades genéticas como causa de morbilidad y mortalidad.

En los países desarrollados, se ha estimado que 52.8 % de ingresos a hospitales pediátricos presentan alguna patología genética y corresponden a ~ 2/3 de las defunciones hospitalarias. La incidencia de las distintas categorías de afecciones genéticas se muestra en la tabla 1.

En Chile, se encontró que la prevalencia de Enfermedades genéticas en un hospital pediátrico era de 62.5 % y su incidencia de 17 %. (Moreno, R. et al., "Frecuencia y características de la morbilidad genética en un hospital pediátrico". Rev. Chil. Ped. 62(2): 112-117, 1991).

III.- CLASIFICACION DE LAS ENFERMEDADES GENETICAS

a. Enfermedades Monogénicas (Mendelianas)

En la descripción de las enfermedades mendelianas se utiliza la siguiente nomenclatura básica:

genotipo: la constitución genética de un individuo con respecto a todo su complemento genético o respecto a un locus en particular.

fenotipo: las características observables de un individuo determinadas por su genotipo y el ambiente en que se desarrolla. En un sentido más limitado, corresponde a la expresión de algún(os) gen(es) en particular.

Rasgo dominante: Característica determinada por un alelo, que se expresa siempre al estado heterocigoto (2 alelos distintos) u homocigoto (2 alelos iguales).

Rasgo recesivo: Característica determinada por un alelo, la que sólo se manifiesta en estado homocigoto (2 alelos iguales).

Alelos: Formas alternativas de un mismo gen, cada uno con una secuencia de bases única.

Locus - loci: Lugar (es) cromosómico(s) ocupado(s) por un gen.

Individuo homocigoto: Individuo que tiene 2 alelos iguales, cada uno localizado en uno de los dos cromosomas homólogos.

Individuo heterocigoto: Individuo que tiene los 2 alelos distintos en los respectivos cromosomas homólogos. También se denomina individuo portador.

En las Enfermedades Mendelianas, está alterado un sólo gen (o locus), de ahí su nombre de monogénicas y se heredan siguiendo los clásicos patrones mendelianos. Aproximadamente, el 1% de los niños nacidos vivos son fenotípicamente anormales debido a la mutación de un gen. Se han reconocido cerca de 5.000 desórdenes potenciales de un gen (Mendeliano) y se sospecha de

muchos otros (On-line Mendelian Inheritance in Man, OMIM, disponible en INTERNET, ver bibliografía).

Ejemplos de Enfermedades Monogénicas:

Dominantes: Corea de Huntington, Hipercolesterolemia familiar.

Recesivas: Fenilcetonuria, Anemia de Células Falciformes, Talasemias, Fibrosis Quística.

Ligadas al X: Hemofilia

Algunas afecciones monogénicas raras se concentran en ciertos grupos raciales y en aquellos grupos donde exista un alto grado de endogamia (consanguinidad), por lo que en estos grupos la frecuencia es mayor que en la población general. Por ejemplo, la Fibrosis Quística en la raza blanca, la Anemia de Células Falciformes en la raza negra, la Beta-talasemia en griegos e italianos, la alfa-talasemia en el Sud-Este asiático y la enfermedad de Tay-Sachs en judíos, son individualmente raras.

Existen afecciones genéticas que pueden presentar alguna de las siguientes características, que pueden originarse en fenómenos de variación ambiental y/o genética.

Penetrancia = capacidad de un gen o genes de expresarse fenotípicamente. Es un concepto estadístico que se expresa en forma porcentual. Ej. penetrancia incompleta (70%) del gen de polidactilia (PP o Pp, dominante), significa que el 70% de los individuos que tienen el genotipo (PP o Pp), que determina el fenotipo polidactilia, lo expresan en el fenotipo polidactilia.

Expresividad = variabilidad en el grado de manifestación fenotípica de un gen o genes. Ej. expresividad variable del gen polidactilia: número de dedos, ubicación, tipo de alteración anatómica (de muñón a dedo completo), etc).

Pleiotropía = expresión fenotípica múltiple de un sólo gen. Efecto fenotípico produce síndromes. Ej. Osteogénesis imperfecta, que afecta huesos, ojos y oídos.

Heterogeneidad genética = producción de un mismo fenotipo por más de un genotipo ("genocopias"). Distintas mutaciones (distintos genotipos) pueden producir el mismo fenotipo clínico. Ej: las Mucopolisacaridosis: un mismo fenotipo (facies gargólica, hepatoesplenomegalia, baja estatura, retardo mental, etc.) es producido por diferentes mutaciones que afectan a diferentes enzimas del metabolismo de los polisacáridos.

Entre las afecciones monogénicas últimamente se ha reconocido un nuevo tipo. Se trata de las afecciones organelares, tales como las Enfermedades Peroxisomales, en que mutaciones génicas pueden alterar la formación normal de los peroxisomas de las células.

Recientemente, se ha mostrado la existencia de nuevos mecanismos de herencia que pueden producir afecciones genéticas y que ponen en jaque la universalidad de las leyes de Mendel ("violación del mendelismo"):

Impronta genética ("Genomic imprinting"). Se refiere a la distinta expresión de algunos genes dependiendo de su origen paternal (materno o paterno). Este fenómeno se manifiesta en el desarrollo embrionario, cáncer, y algunas afecciones monogénicas que muestran diferencias fenotípicas, dependiendo de si heredaron genes o regiones cromosómicas paternas o maternas. Los experimentos de transplantes de pronúcleos en ratones realizados para construir cigotos conteniendo sólo cromosomas paternos (androgenéticos) o

maternos (ginogenéticos), probaron que la contribución de la madre es diferente y complementaria a la del padre. Ambas condiciones de cromosomas uniparentales son letales. Existen homologías a esta situación en humanos: es el caso de las molas hidatidiformes (que son generalmente androgenéticas en su origen) y los teratomas (que habitualmente son ginogenéticos). Un ejemplo de afección genética que puede ser originada por imprinting es el caso del Síndrome de Prader-Willi y el Síndrome de Angelman.

Disomía uniparental. Se refiere a la condición en que ambos cromosomas de un par derivan del mismo padre. Como resultado pueden expresarse afecciones monogénicas, tales como la Fibrosis Quística (afección recesiva), cuando un padre portador transmite las dos copias idénticas del cromosoma 7 que lleva el alelo enfermo. Es decir, el paciente homocigoto recesivo afectado hereda ambos cromosomas 7 de un sólo padre que era heterocigoto.

b. Enfermedades Poligénicas (Multifactoriales):

En las Enfermedades Poligénicas existen varios genes (poligenes) ubicados en distintos cromosomas, de efecto fenotípico aditivo, no discernible individualmente y una fuerte dependencia ambiental (multifactorial). Como ejemplo se tiene a las enfermedades comunes, tales como Diabetes, Hipertensión Arterial, Malformaciones Congénitas.

Aproximadamente un 1 a 2 % de neonatos que presentan alguna malformación congénita, poseen un complemento cromosómico normal y aparentemente no han sufrido mutación en el locus de un gen. En ellos, se supone que varios genes diferentes estén comprometidos (herencia poligénica/multifactorial). En esta categoría están incluidas la mayoría de las malformaciones limitadas a un solo órgano o sistema: hidrocefalia, anencefalia, espina bífida (defectos del tubo neural) hendiduras faciales (labio y paladar hendido), defectos cardíacos, estenosis pilórica, onfalocelo, luxación de cadera, etc. Algunas de estas afecciones requieren de un umbral de expresión: sobre un determinado número de poligenes se presenta la afección, gatillada supuestamente por algún factor ambiental. Para el caso de algunos casos de defectos del tubo neural, además de los poligenes se ha logrado identificar al ácido fólico como un factor ambiental contribuyente en la aparición de tales defectos.

c. Enfermedades Cromosómicas

En las Enfermedades Cromosómicas, la alteración genética es de tal magnitud, que es posible visualizar el daño genético como una alteración en los cromosomas, ya sea en el número o en la estructura de algún cromosoma en particular. La alteración cromosómica habitualmente involucra a muchos genes. En general, alrededor de 1% de los nacidos vivos presenta alguna alteración cromosómica. Ejemplos de alteraciones cromosómicas i) numéricas: la trisomía 21 en el Síndrome de Down (47, XX o XY, +21); la monosomía X en el Síndrome de Turner (45,X); ii) estructurales, tales como la trisomía 21 por translocación 14/21 (46, XX o XY, t(14;21), +21); deleción del brazo largo del cromosoma 15 (46, XX o XY, del 15q 11-13) del Síndrome de Prader-Willi.

d.- Otras

1.- Enfermedades mitocondriales: Son enfermedades genéticas raras, en las que el defecto genético se localiza en el ADN que poseen las mitocondrias, por lo que clínicamente exhiben una herencia de tipo materna. Dado que los varones heredan sus mitocondrias de sus madres, ellos son afectados pero no transmiten la enfermedad a sus hijo(a)s. Ej. Neuropatía óptica de Leber (LHON); MELAS (Mitochondrial Encephalophalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes)

2.- Las afecciones debido a Imprinting genético (impronta genética), que son consecuencia de la expresión diferencial de genes dependiente del origen de los cromosomas. Ejemplo el Síndrome de

Prader-Willi v/s S. Angelman, que son debidos a alteraciones genéticas del cromosoma 15 paterno y materno, respectivamente.

3.- Las afecciones por disomías uniparentales, por herencia de los 2 cromosomas homólogos de un mismo progenitor. Por ejemplo, el caso de Fibrosis Quística, debido a la presencia de los dos cromosomas 7 maternos (portadores de la mutación) en un mismo paciente.

4.- Las afecciones por defectos genéticos de células somáticas. Una mutación en el huevo fertilizado puede transmitida a todas las células hijas. Sin embargo, si la mutación ocurre después de las primeras divisiones, entonces se originan mosaicos (dos o más genotipos distintos en un mismo individuo). Este mosaicismo puede ser gonadal, somático o ambos. El cáncer es un ejemplo de este tipo de afección.

A pesar de que no se trata de afecciones genéticas propiamente tales, conviene recordar a las **Afecciones teratogénicas**. Se trata de afecciones causadas por exposición a factores exógenos, (drogas, virus, etc.,) que afectan nocivamente a un embrión que, de otra manera, estaba destinado a desarrollarse normalmente. Estos factores se denominan genéricamente teratógenos. Sólo se conocen 15-20 agentes teratógenos comprobados, a pesar de que se sospecha que muchas otras sustancias puedan serlo. No se trata de afecciones genéticas propiamente tales, sin embargo, pueden producir fenotipos similares a aquellos causados por alteraciones genéticas, llamados fenocopias. La acción de un teratógeno depende de múltiples factores. La relación cuantitativa de los teratógenos conocidos con la incidencia de anomalías es relativamente pequeña, con excepción del alcohol (Síndrome de Alcohol Fetal).

IV.- FISIOPATOLOGIA

Desde el punto de vista fisiopatológico, varios mecanismos pueden explicar la aparición de estas afecciones, como consecuencia de mutaciones en los genes:

1.- Mecanismos moleculares relacionados a Afecciones monogenéticas:

recesividad: deficiencia enzimática : Un homocigoto para un gen recesivo que codifica para una determinada enzima, no presenta la enzima (E) por lo tanto el sustrato (S) de esas enzima se acumulará y habrá carencia del producto (P) de la reacción. Los heterocigotos que poseen un fenotipo normal, presentan la mitad de la cantidad normal de la enzima. (0.5 E). Por ello, se acumula sustrato (2S), lo que activa la enzima para producir una cantidad normal de P. Este mecanismo se ha mostrado para muchas enfermedades recesivas metabólicas, tales como la fenilcetonuria.

dominancia: alelos mutantes producen productos deletéreos: Si el producto de un gen mutante altera la función del producto génico normal, la mutación tiene un efecto dominante negativo, porque actúa como un producto deletéreo. Por ejemplo, una proteína tetramérica en que una de las subunidades mutantes anula el efecto biológico total. La Osteogénesis imperfecta por defecto de alguno de los genes del colágeno, produce moléculas de colágeno anormal que impide el ensamblaje adecuado.

alelos mutantes producen insuficiencia por haploidía: Existen mutaciones en enzimas que producen ausencia de función incluso cuando existe la mitad del nivel normal de la enzima (insuficiencia por haploidía). Ejemplos: Porfiria aguda intermitente, por mutaciones en el gen de la uroporfirinógeno sintasa, Hipercolesterolemia familiar por mutaciones en el receptor de LDL.

alelos mutantes producen aumento de actividad enzimática: un aumento en la actividad enzimática, producirá una baja de sustrato y se generará el producto normalmente. Pero si el mismo sustrato,

ahora reducido, es utilizado en otras vías metabólicas tendrá un efecto dominante. Por ejemplo, el gen de la enzima PRPP sintetasa (Ligada al X) que controla la velocidad de la síntesis de purinas.

alelos mutantes producen ganancia de una función: Existen mutaciones que producen expresión ectópica (en un lugar donde normalmente ese gen no se expresa) o ecrónica (en un tiempo inapropiado en las células adecuadas). Por ejemplo, mutaciones homeóticas en *Drosophila*, imprinting.

efectos de posición: la expresión de los genes depende de su posición en el cromosoma. Por ejemplo, regiones de heterocromatina, regiones de hipermetilación corresponden a sectores silenciadoras de la expresión génica. El locus del Corea de Huntington puede presentar un efecto de posición.

amplificación de nucleótidos. Existe un grupo de afecciones genéticas debidas a amplificación de nucleótidos, siendo la amplificación de tripletes, las más frecuentes del grupo. Esta amplificación es una característica polimórfica en la población, que puede localizarse dentro o fuera de los genes y que puede traducirse en ganancia o pérdida de la función de la proteína. La afección más característica de este grupo es el Síndrome de X frágil, en la cual la amplificación de CGG sobre 200 repeticiones, produce una inactivación del gen FMR-1.

Imprinting genético. El sello molecular de los genes (o impronta génica) puede producir inactivación génica. Un grado de metilación diferente puede explicar molecularmente el imprinting. Por ejemplo, el imprinting en la región 15q en el Síndrome de Prader-Willi.

La dominancia y recesividad varían según el nivel de observación. Por ejemplo, los portadores (heterocigotos) de una afección recesiva son clínicamente sanos, sin embargo, celular y molecularmente, ellos tienen una deficiencia parcial de la enzima (o proteína) involucrada.

Las afecciones dominantes en estado homocigoto habitualmente producen un cuadro clínico más severo que al estado heterocigoto.

Muchas afecciones monogénicas presentan penetrancia incompleta y expresividad variable. La explicación fisiopatológica más convincente para este fenómeno es la interacción génica por epistasia. Es decir, genes involucrados directa o indirectamente con el gen en cuestión (por ejemplo a nivel de rutas metabólicas) impiden el efecto de ese gen, cambiando el fenotipo que se espera de acuerdo al genotipo.

2.- Mecanismos de producción de alteraciones cromosómicas

- no disyunción cromosómica en meiosis y mitosis. La no separación de cromosomas homólogos durante la primera o segunda división meiótica, produce gametos aneuploides (con un número de cromosomas distinto a 23 cromosomas). La no separación de cromátidas de cromosomas durante la división mitótica, produce células con un número de cromosomas distinto a 46 cromosomas. Si este fenómeno ocurre durante el desarrollo embrionario, se producen mosaicos (coexistencia de dos líneas celulares genéticamente distintas en un mismo individuo).

- ruptura y selladura cromosómica. Existen varios agentes tales como radiaciones ionizantes, drogas quimioterapéuticas, etc, que producen ruptura en el ADN (hebra simple en G1 y doble hebra en G2) que deben sellarse correctamente, de lo contrario se pueden producir deleciones cromosómicas, inversiones cromosómicas, translocaciones cromosómicas, etc. Es importante señalar que la posición de los cromosomas en el núcleo interfásico que sigue un cierto orden (arquitectura nuclear), es un aspecto importante en la génesis de alteraciones cromosómicas estructurales, como por ejemplo, la translocación 14/21 en Síndrome de Down.

3.- Mecanismos de producción de alteraciones poligénicas

Desafortunadamente, los mecanismos fisiopatológicos de este grupo de afecciones son los menos conocidos. Se asume que los poligenes tienen un efecto aditivo, es decir, los distintos poligenes tienen un efecto común aumentando el valor del fenotipo sobre una basal. Por ejemplo, si asumimos 2 poligenes (A y B) para la hipertensión arterial, en que A otorga 5 mm Hg y B 10 mm Hg, entonces una persona que tiene el genotipo AABB, tendrá 30 mm Hg sobre una basal respecto a una persona de genotipo aabb. Existen loci que determinan rasgos poligénicos, denominados QTLs (Quantitative Trait Loci) que se están caracterizando en la actualidad.

Las afecciones poligénicas son por definición multifactoriales, ello significa que no sólo poseen una base genética (los poligenes) sino que poseen una fuerte dependencia ambiental. Por ejemplo, además de los poligenes en la hipertensión arterial, influyen factores ambientales tales como dieta con sal, stress, etc. ¿Cómo estos factores interactúan para desencadenar la afección?. No se conoce.

V.- MÉTODOS DIAGNOSTICOS DE LAS AFECCIONES GENÉTICAS

Se debe sospechar una afección genética frente a un niño "distinto", que se sale de las características físicas y de comportamiento habituales. Como por ejemplo, ante un niño que presente: bajo peso, pequeño para edad gestacional, hipotonía, malformaciones externas e internas, dismorfias, dificultad para alimentarse, vómitos, somnolencia, convulsiones, etc.

La conducta a seguir frente a un niño que presente alguna de las características mencionadas, es consultar a un especialista en Genética Clínica, quien tratará de realizar el diagnóstico específico, con la ayuda de otros especialistas y el apoyo de los exámenes de laboratorio necesarios. Los pilares del diagnóstico de una afección genética son: la historia clínica, el examen físico y los exámenes de laboratorio.

1.- Historia clínica

Debe hacerse una buena historia clínica del niño (prénatal- perinatal y postnatal), una historia familiar buscando: una afección similar en los parientes o una afección que "corra" en la familia, antecedentes de consanguinidad y de etnicidad. Debe hacerse un árbol genealógico lo más completo posible. Se puede proceder preguntando acerca de la situación de los parientes en primer grado (hermanos, padres, hijos), de los parientes en segundo grado (sobrinos, sobrinas, tías, tíos, abuelos) y de los parientes en tercer grado (primos hermanos). Se deben aclarar los resultados reproductivos adversos tales como abortos espontáneos repetidos, nacidos muertos y niños nacidos vivos con anomalías. La edad avanzada del padre (final de la cuarta y quinta década) está asociada significativamente más asociada con mutaciones mendelianas. La edad materna avanzada esté asociada a anomalías cromosómicas, particularmente con la trisomía 21. Es importante señalar que toda información consignada en la genealogía debe ser comprobada.

2.-Examen físico

El examen físico del niño debe ser acucioso, completo y cuantificable (para rasgos fenotípicos que presentan una distribución normal en la población). Especialmente importante es el examen de la cara, de las extremidades, y los dermatoglifos (disposición de las crestas dérmicas palmares y plantares).

Uno de los objetivos del examen físico es la búsqueda de malformaciones, que pueden ser a) mayores (aquellas con consecuencias médica y/o cosmética seria para el paciente. Incidencia ~ 2%.

Ej: Cardiopatías congénitas; b) menores: caracteres morfológicos inusuales que no son serios ni médica ni cosméticamente para el paciente. Incidencia ~ 4% (raza dependientes). Ej.: surco simiano, pezón extra numerario, etc. y c) variantes normales: incidencia + 4%. Ej.: epicanto.

3.- Exámenes de laboratorio

Laboratorio corriente. Orina, Rayos X, sangre, ecografía, scanner, resonancia magnética nuclear, etc.

Dermatoglifos. Si bien no existen dermatoglifos patognomónicos, pueden ayudar en algunos diagnósticos. Se requiere conocer patrones normales chilenos.

Exámenes Citogenéticos (cromosómicos)

Cromatina sexual X (de Barr) e Y (cromatina Y): orienta a alteraciones en número y forma de cromosomas sexuales. Sin embargo, dado que requiere confirmación cromosómica (cariotipo), en muchos laboratorios este examen no se practica. La cromatina sexual X, corresponde a un cromosoma X inactivo. Una mujer normal (XX) inactiva uno de sus dos cromosomas X, para compensar dosis génica en relación al hombre normal que posee sólo un cromosoma X. La inactivación del cromosoma X ocurre al azar, tempranamente en el desarrollo embrionario y afecta a la mayoría de los genes ubicados en el cromosoma X. En los núcleos de las células existirán tantos corpúsculos X, como cromosomas X-1, posea el individuo. La cromatina Y, corresponde a la presencia de un cromosoma Y. Ambos exámenes de cromatina se han utilizado para el diagnóstico del sexo de fetos, embriones y células sexuales. Se solicita exámenes de cromatina en casos de pacientes con Genitales externos ambiguos y pacientes con signos de alteraciones genéticas sexuales, tales como estigmas de Síndrome de Turner, de Klinefelter, etc.

Cariotipo (o Cariograma): Corresponde al estudio de todos los cromosomas. Los cromosomas pueden obtenerse directamente de células en proliferación (médula ósea, exudados tumorales, etc.) o de cultivos celulares (linfocitos, amniocitos, fibroblastos, células tumorales, etc.). Actualmente pueden también estudiarse los cromosomas directamente de espermios y óvulos. Los cromosomas obtenidos se bandean y tiñen, se fotografian al microscopio y se ordenan en parejas de homólogos de acuerdo a pautas internacionales (cariotipo). Recientemente se han desarrollado técnicas moleculares que permiten identificar a cada uno de los cromosomas humanos, con sondas moleculares muy específicas. Una de estas técnicas más utilizadas en diagnóstico genético prenatal y preimplantacional, corresponde al FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), que utiliza sondas moleculares fluorescentes para detectar cromosomas y sectores cromosómicos específicos. Esta técnica incluso permite estudiar los cromosomas en interfase. El cariotipo esté indicado en pacientes con retardo mental con o sin anomalías congénitas múltiples; en padres de pacientes con rearrreglos cromosómicos; en hijos de padres con rearrreglos balanceados; en parejas con 2 o más abortos espontáneos o con abortos y recién nacidos muertos; en parejas con infertilidad de etiología desconocida; en pacientes con genitales ambiguos, con amenorrea 1a o 2a de origen oscuro, en pacientes con falla puberal y en pacientes con alteraciones conductuales.

Exámenes Bioquímicos

Screening metabólico: orienta a errores innatos metabolismo o Enfermedades Metabólicas: tales como Fenilcetonuria e Hipotiroidismo congénito (Ambas condiciones de pesquisa obligatoria en Chile). Además, otros tests orientan a Cistinurias, Mucopolisacaridosis, Gangliosidosis, Aminoacidopatías, etc.

Determinaciones enzimáticas directas o de sustratos o de productos (en sangre o tejidos).
Ejemplo: Hiperuricemia y cuantificación de HGPRT en Síndrome de Lesch-Nyhan.

Estudios moleculares: secuenciación de ADN, Southern blotting (DNA), ASO (Allele Specific Oligonucleotides), Northern blotting (RNA), Western blotting (proteínas), Hibridación in situ, PCR (Polymerase Chain Reaction), Multiplex PCR; RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism); DNA fingerprints (huellas digitales del DNA); FISH (Fluorescence In situ Hybridization).

Métodos de Genética de células somática (cultivos celulares): Determinación de enzimas, metabolitos, receptores, DNA, vías metabólicas en células cultivadas "in vitro", por ej.: incorporación de S04* en células de Mucopolisacaridosis, etc.

VI.- TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES GENÉTICAS

VI.1.- Consejo Genético.

Muchas enfermedades genéticas tienen tratamiento. Sin embargo el Consejo Genético, continúa siendo la etapa más importante en la prevención primaria. La asesoría genética, una vez validado el diagnóstico, se refiere a la entrega, por parte de especialistas, de información en cuanto a riesgos de recurrencia individuales y familiares, lo que incide en el pronóstico reproductivo a nivel individual y familiar.

VI.2.- Screening de afecciones genéticas.

Es importante señalar que existen métodos de screening de afecciones genéticas: para identificar algunas patologías específicas que requieren de tratamiento oportuno o consideraciones especiales en cuanto a consejo genético. Entre estos métodos destacan: el screening de recién nacidos (por ejemplo de Fenilcetonuria e Hipotiroidismo congénito), screening de poblaciones a riesgo (por ejemplo la Enfermedad de Tay Sacks en judíos), y el screening de portadores. Un caso especial de screening corresponde al Diagnóstico Prenatal Genético (mediante biopsia de vellosidades coriales; amniocentesis; "alfa-fetoproteína en sangre materna; ecografía, cordocentesis; células fetales en sangre materna, fetoscopia, etc.), que corresponde a la detección durante el embarazo de alguna patología genética. Habitualmente su finalidad es ofrecer un aborto mal llamado "terapéutico" de fetos afectados. Categóricamente se trata de un aborto eugenésico. Actualmente se dispone incluso de métodos de Diagnóstico genético preimplantacional (análisis diagnóstico de una o más células embrionarias), que conlleva a implantación de embriones no afectados (Selección embrionaria).

VI.3.- Tratamiento de afecciones genéticas

Una vez realizado el diagnóstico en forma pre o postnatal, existen medidas terapéuticas que mejoran la calidad de vida de los pacientes afectados. Muchas enfermedades genéticas son tratables, mediante la aplicación de medidas paliativas. Ej: dietas de eliminación: fenilalanina en Fenilcetonuria; suplementación de cofactores: Factor VIII de la coagulación en Hemofilia; reemplazo de enzimas: glucocerebrosidasa en la Enf. de Gaucher; trasplante de órganos: Médula ósea en Talasemia; medidas quirúrgicas tales como corrección: Labio leporino, etc.

También es posible realizar Terapia preventiva de patología genética, como es el caso de la escisión quirúrgica del colon (colectomía) en Poliposis Familiar del Colon.

En la actualidad, ya se esté ensayando la Terapia Génica, para intentar curar algunas afecciones genéticas. En terapia génica se trata de usar la tecnología del DNA recombinante (Ingeniería Genética) para corregir un gen defectuoso, y ojalá reemplazarlo por el gen normal, en forma

permanente. De acuerdo al tipo de célula blanco, la Terapia Génica puede ser: 1) de tipo somática, que tiene validez para el individuo que recibe la terapia y para la que existe gran consenso en su utilidad y 2) de tipo germinal, que no sólo modificaría tal información genética del individuo que la recibe, sino que él transmitirá esa modificación a sus descendientes, con insospechadas consecuencias, por lo que ella tiene grandes problemas éticos y es censurada por la inmensa mayoría de científicos y médicos.

Para que una enfermedad genética sea susceptible de ser tratada mediante terapia génica somática, se requiere conocer el gen defectuoso que la produce y habitualmente se requiere contar con un modelo celular in vitro de la afección: 1) el gen debe ser transferido a las células blanco (en las que se expresa el defecto) y permanecer en ellas. La transferencia (o transfección) puede ser realizada por una serie de métodos, tales como electroporación, liposomas, microinyección, virus (vectores biológicos, ej: retrovirus, adenovirus, etc). Cuando se transfiere el gen a células blanco obtenidas del propio paciente y luego de modificarse genéticamente son regresadas a él, se habla de terapia génica "ex vivo", en contraste a la terapia "in vivo", que consiste en transferir los genes directamente al paciente; 2) el gen debe funcionar adecuadamente en el genoma de la célula huésped y 3) la presencia del gen no debe ser "dañina".

Actualmente ya se estén llevando a cabo varios intentos de terapia genética humana clínicamente controlados. Entre ellos destaca, el caso de la Inmunodeficiencia Severa Combinada ("niños en burbujas"), que clínicamente se traduce en frecuentes y graves episodios de cuadros infecciosos, debido a la falla de los mecanismos inmunológicos de defensa frente a las infecciones. Esta afección genética puede deberse a fallas en el gen que codifica para la enzima Deaminasa de adenosina (ADA). En este caso, la terapia genética consiste en la transformación in vitro de células de la médula ósea (que poseen el gen ADA alterado) con el gen normal de la enzima ADA y luego reincorporar estas células al paciente. Los resultados hasta la fecha son alentadores. Desafortunadamente, a fines de 2000, se produjo la primera muerte de un paciente tratado por terapia génica (por una reacción adversa al vector viral utilizado), por lo que los protocolos médicos están siendo reevaluados.

VII.- MANIPULACION DE EMBRIONES HUMANOS

Como consecuencia del desarrollo de las técnicas de Fertilización in vitro (FIV), actualmente es posible la manipulación de los embriones humanos, con fines diagnósticos. Hoy en día es posible el diagnóstico genético preimplantacional. No sólo es factible determinar el sexo del embrión fertilizado in vitro ("sexaje de embriones") y antes de ser implantado, sino que también se han desarrollado sofisticadas técnicas de diagnóstico molecular, incluso a nivel de desarrollo embrionario tan temprano como es el caso del estado de dos células (blastómeros). Actualmente se dispone de microchips de ADN (contenidos en un portaobjetos donde se puede aplicar ADN aislado de una sola célula embrionaria y diagnosticar la presencia de sobre 10.000 mutaciones. Ello con el fin de pesquisar enfermedades genéticas y realizar así implantación de sólo aquellos embriones sanos ("selección embrionaria"). A fines del año 2000, Inglaterra aprobó la utilización de embriones para obtener células troncales (stems) obtenidas de embriones al estado de blastocisto, para diferenciarlas in vitro y producir células diferenciadas a voluntad (neuronas, cardiocitos, etc). Ello enmarcado en la legislación inglesa que sólo considera seres humanos a los embriones cuando ellos desarrollan su sistema nervioso (día 14 del desarrollo embrionario). Más aún, se sugiere utilizar embriones congelados sobrantes de la FIV (embriones huérfanos) para este tipo de manipulación. Definitivamente, se trata de una medida éticamente reprochable, puesto que involucra la destrucción de seres humanos al estado embrionario.

VIII.- CLONACION

En Febrero de 1997, el Dr. Ian Willmut y su grupo de investigación en Gran Bretaña, logró producir el primer mamífero clonado a partir de una célula de un tejido adulto diferenciado: se trata de la oveja Dolly. Para su producción Willmut obtuvo células de la glándula mamaria de una oveja las que puso a cultivar en el laboratorio. De otra oveja obtuvo óvulos a los que les retiró quirúrgicamente sus núcleos, y luego fusionó estos óvulos sin núcleos con las células mamarias. Estas que contienen todos los cromosomas (y genes) de la oveja, aportaron el material genético para que los óvulos sin núcleos se desarrollaran en embriones. Los embriones cuyo desarrollo embrionario comenzó en el laboratorio, se implantaron en ovejas-madres hospederas y de más de doscientos experimentos realizados, nació finalmente Dolly que corresponde a un clon de la oveja dadora de las células mamarias. Se trata de un clon, dado que se ha obtenido un ser vivo que es una réplica de otro adulto, sin que medie reproducción sexual. Luego, se obtuvo una oveja clonada, llamada POLLY, que posee un gen humano. Y más recientemente, se logró clonar a ratones. Esta metodología no es posible de aplicar al hombre en la actualidad, ya que existen limitaciones éticas y técnicas. Sin embargo, informaciones de prensa indican que una investigadora china habría realizado el protocolo de Dolly, utilizando núcleos de linfocitos humanos y los clones producidos estarían congelados en estado embrionario.

Por otra parte, es necesario notar que actualmente es posible realizar otra metodología de clonación, llamada mellizaje ("twinning"). Ella consiste en separar las dos células que se producen luego de la primera división del cigoto (blastómeros) y permitir el desarrollo de cada una de ellas por separado. Ello fue logrado con embriones humanos anormales por científicos de la U. De Washington, USA en 1993. Esta técnica intenta reproducir lo que espontáneamente sucede en la naturaleza con el caso de los mellizos monocigóticos. Más aún, hoy existen monos vivos que se obtuvieron mediante esta metodología, es decir clones de monos obtenidos por mellizaje. Lo perturbador de esta situación es que sólo se dio a conocer inmediatamente después de la revelación de Dolly, siendo que la experimentación que llevó a producir estos monos tuvo que realizarse desde hace un par de años, sin que se conociese su existencia. Estos resultados demuestran la factibilidad técnica para la realización de este tipo de clonación en seres humanos. Afortunadamente, la clonación humana ha recibido un unánime rechazo por parte de toda la sociedad, fundamentalmente por razones éticas. Sin embargo, a fines de 1998, un científico coreano reportó la clonación de embriones humanos, los que habría congelado. Finalmente, dos especialistas en reproducción, los Dres. Savos (USA) y Antinori (Italia) en Febrero del 2001, han manifestado públicamente su intención de clonar seres humanos mediante la metodología de Dolly, con fines reproductivos, para parejas infértiles.

Es de esperar que el hombre aplique sabiamente los grandes conocimientos biológicos que ha logrado obtener recientemente, para intentar mejorar la calidad de vida de aquellos seres humanos afectados por enfermedades genéticas discapacitantes.

IX.- RESUMEN Y CONCLUSION

El estudio clínico de un niño posiblemente afectado por una Enfermedad genética requiere de una gran experiencia y mucha prudencia para proponer una hipótesis diagnóstica. De ella dependerán el pronóstico del niño y el consejo genético adecuado a los padres. Un error puede tener graves consecuencias.

Actualmente los genetistas clínicos experimentados conocen bien alrededor de unos 200 síndromes dismórficos, los más frecuentes, lo que representa solamente un pequeña parte (5%) de lo descrito en la literatura internacional. Esta última sigue enriqueciéndose continuamente. Esto hace indispensable consultar permanentemente las bases de datos correspondientes, sin olvidar la importancia de una buena base clínica. Aún así, actualmente, los mejores equipos especializados en dismorfologías estiman poder llegar a un diagnóstico sindrómico certero, en el mejor de los casos, solamente, en el 50% de los pacientes. Por lo tanto se recomienda ser prudente y no pretender hacer un diagnóstico a toda costa. Además debe mantenerse a los padres bien informados. Finalmente, tras la evolución del morfotipo con la edad junto con los rápidos ingresos de los conocimientos en genética, se aconseja seguir controlando periódicamente el niño sin diagnóstico certero con un equipo multidisciplinario

X.- BIBLIOGRAFIA

1.- TEXTOS

Santos, MJ & Morizon, G. Cap. 14: Enfermedades genéticas en el RN: enfoque clínico" En: Tapia, J.L y P. Ventura. Eds. Manual de Neonatología. 2a Ed. (Ed. Mediterráneo) 2000; 113- 120.

Santos, M. "Apuntes de Genética General, Humana y Médica". Editado por la Fac. Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, 1994.

Nelson et al. (eds) "Pediatria", Parte IX: Genética Humana. Ed. 1997. pp. 375-410.

Fauci et al. (eds) "Harrison's Principles of Internal Medicine", Section: "Genetics and Disease". 14th Ed., 1998, pag. 365-409.

Gelehrter, T.D. & F.S. Collins: "Principles of Medical Genetics". Williams & Wilkins, 2nd. Ed. 1998.

Scriver, C. R., Beaudet, A.L., Sly, W. S. & D. Valle. "The Metabolic Basis of Inherited Diseases" McGraw-Hill Book Co., 7 th Ed., 1994.

2.- ATLAS

Jones, K.L.J. "Smith's Recognizable patterns of Human Malformations" (W.B. Saunders Co.), Philadelphia, USA, 5th. Ed. 1997.

Buyse, M.L. (Ed) "Birth Defects Encyclopedia". 2nd. Ed. Blackwell Sci. Pub. 1990.

Bergsma, D. "Birth Defects Compendium" Alan R. Liss, Inc. 2nd Ed., 1979.

Grouchy, J. et C. Turleau "Atlas des Maladies Chromosomiques" Expansion scientifique Francaise, 2nd. Ed., 1982

3.- BASES DE DATOS

"London Dysmorphology Database" (Oxford Medical Databases). Oxford University Press, 1994.

Shinzel, A. (ed) "Human Cytogenetics Database" (Oxford Medical Databases). Oxford University Press, 1994.

4.- DIRECCIONES DE INTERNET

OMIM (On line Mendelian Inheritance in Man)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>

Human Genome project Information
<http://www.ornl.gov/hgmis/home.html>

CLONACIÓN HUMANA

Dr. Manuel J. Santos A.
Médico Genetista y Doctor en Ciencias. Facultad de Ciencias Biológicas y Medicina,
Pontificia Universidad Católica de Chile.

INTRODUCCIÓN

El 12 de Marzo del 2004, a través de la revista *Science*, se dio a conocer un hallazgo que no sólo ha impactado profundamente el ambiente científico, sino que a la sociedad entera. Se trata del reporte de la clonación del primer ser humano (al estado embrionario), por parte de un grupo de investigadores coreanos (Hwang et al., 2004). Sin duda, se trata de un acontecimiento científico importante. Sin embargo, su mayor impacto es definitivamente a nivel bioético.

De acuerdo a la Real Academia de la Lengua Española, la definición de clonación corresponde a un conjunto de células u organismos genéticamente idénticos, originados por reproducción asexual a partir de una única célula u organismo o por división artificial de estados embrionarios iniciales (Figura 1). Si bien la clonación corresponde a una estrategia reproductiva utilizada por varios seres vivos inferiores (bacterias, protozoos, organismos unicelulares), en los seres vivos superiores (animales y plantas) es un evento infrecuente. Sin embargo, sorprendentemente, entre los animales, un tipo particular de clonación ocurre en forma espontánea en los seres humanos (en el caso de los mellizos monocigóticos).

La cabal comprensión del fenómeno de la clonación de seres humanos requiere revisar los conceptos más fundamentales de la genética humana.

GENOMA HUMANO

Las características observables de un individuo (fenotipo) están determinadas por los genes y el ambiente. El conjunto de genes de un individuo

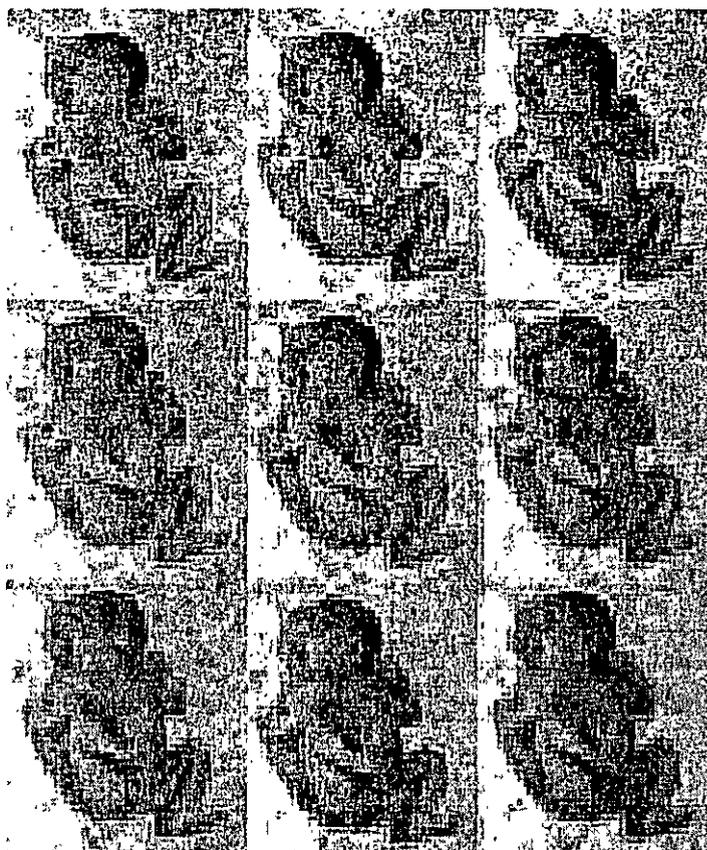


Figura 1. Clonación Humana.

corresponde al genotipo. La totalidad de la información genética es lo que se llama genoma.

Los genes –unidades de herencia– residen en los cromosomas (Figura 2). La información genética se encuentra codificada en pequeños trozos de la molécula de ADN. El ADN (ácido desoxirribonucleico) es una molécula semejante a una escalera doblada en forma de hélice. Los “largeros” de la escalera están formados por moléculas de azúcar unidas a fosfato y los “peldaños” están formados por moléculas denominadas bases

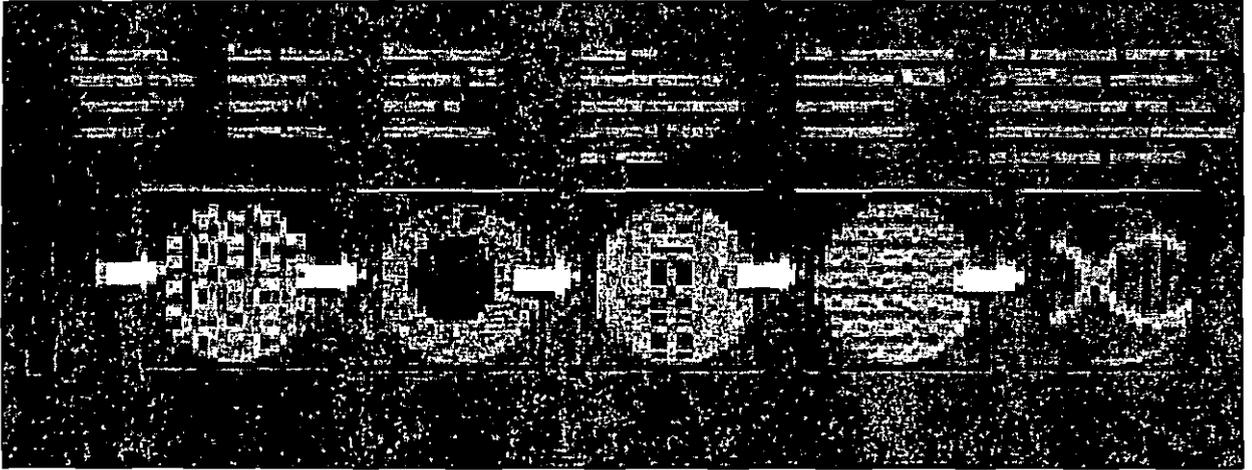


Figura 2. Niveles de organización de los seres humanos.

nitrogenadas (o "letras"). Existen 4 bases nitrogenadas en el ADN: A (adenina); G (guanósina); T (timina) y C (citósina). Siempre A se une con T y G con C, por tanto existen sólo dos tipos de peldaños: A-T y G-C. Toda la información genética reside en la ordenación particular (o "secuencia") de estas 4 letras. Los genes corresponden a segmentos de esta molécula de ADN, con una función particular y caracterizados por una secuencia específica de miles de estas 4 letras (los genes humanos contienen desde 1.500 hasta 2.000.000 de bases nitrogenadas). Generalmente, un gen corresponde a una secuencia que determina una función específica, como por ejemplo, la formación de una proteína que cumpla un rol específico en las complejas vías metabólicas que presentan las diferentes células de nuestro organismo.

Las células humanas contienen aproximadamente 11/2 mt de ADN, que está dividido en 46 segmentos que a su vez, constituyen los 46 cromosomas. Cada cromosoma está formado por una molécula de ADN. En los 22 pares de cromosomas autosómicos humanos y en el par sexual X e Y, existen aproximadamente 30.000 genes. El llamado «Proyecto del Genoma Humano (PGH)» es un proyecto de investigación billonario cuyo propósito es conocer la secuencia de todo el ADN humano (que contiene alrededor de 3.2 billones de bases nitrogenadas), conocer los ~30.000 genes normales y conocer genes involucrados en enfermedades, entre los que destacan los genes relacionados con cáncer, por ejemplo, cáncer de mama (<http://www.oml.gov/hgmis/home.html>).

Actualmente, en el 2004, ya se conoce la secuencia completa del genoma humano, alrededor de 22.000 genes normales y miles de genes involucrados en enfermedades (Bentley D, 2004). También existe

ADN en el citoplasma celular. Se trata del genoma mitocondrial que contiene alrededor de 16600 bases nitrogenadas (de secuencia conocida) y 37 genes (conocidos) involucrados con la función energética mitocondrial.

Con todo el revuelo que ha provocado el PGH, existe el peligro de considerar que todas las características biológicas de un ser humano radican en sus genes (reduccionismo genético). Sin embargo, conviene señalar que los genes necesitan interactuar entre sí y con el ambiente para desarrollar su potencialidad. El caso de los genes que determinan el grupo sanguíneo ABO (localizados en el cromosoma 9), representa un buen ejemplo de esta situación. Las personas que presentan el grupo sanguíneo A, poseen el gen IA que tiene un efecto fenotípico dominante. Sin embargo, existen personas que a pesar de poseer el gen dominante IA no presentan el grupo sanguíneo A. Ello puede ser debido a que estas personas poseen otro gen, llamado H (localizado en otro sitio del genoma), que al interactuar con el gen IA a nivel de la ruta metabólica específica, impide que aquél ejerza su efecto (resultando en un fenotipo distinto, en este caso grupo sanguíneo O). Esta situación denominada interacción génica epistática, demuestra que no basta con poseer un determinado gen para que éste necesariamente se exprese en el fenotipo. Por otra parte, existen condiciones ambientales que inciden en que un determinado gen se exprese o no. Por ejemplo, la focomelia (ausencia de extremidades) que puede ser producto de «genes de focomelia», también puede producirse por causas ambientales (en individuos que no poseen los «genes de

focomelia», tal como ocurre en hijos de madres que ingieren talidomida durante el embarazo y que remeda el efecto de genes de focomelia). Estos ejemplos muestran la importancia de la llamada Ecuación fundamental de la Genética:

GENOTIPO + AMBIENTE \longrightarrow FENOTIPO

Es decir, todo fenotipo es el resultado de un genotipo que se expresa en un determinado ambiente y de las interacciones entre ellos (Figura 3). En otras palabras, no basta el genoma para producir las características biológicas normales y patológicas de los seres humanos.

El Proyecto del Genoma Humano tiene un profundo impacto a nivel ético, legal y social (ELSI), por lo que un monto significativo de sus fondos está dedicado a analizar estas implicancias. Entre ellas, conviene señalar: el acceso a la información de las características genéticas de las personas por parte de las aseguradoras de salud y empleadores, las consecuencias del conocimiento del estado de portador de una enfermedad genética que se desarrollará en el futuro, el debate de ideas eugenésicas y racistas, etc. Un ejemplo emblemático corresponde al gen que da susceptibilidad a cáncer de mama en las mujeres (oncogen BRACA): si una mujer se realiza el test para este gen, ¿las Isapres y los empleadores tienen derecho a conocer esta información antes de asegurar o emplear?

Inicio del desarrollo del embrión humano

El desarrollo de un ser humano comienza en el momento de la fecundación (Pearson, 2002). El

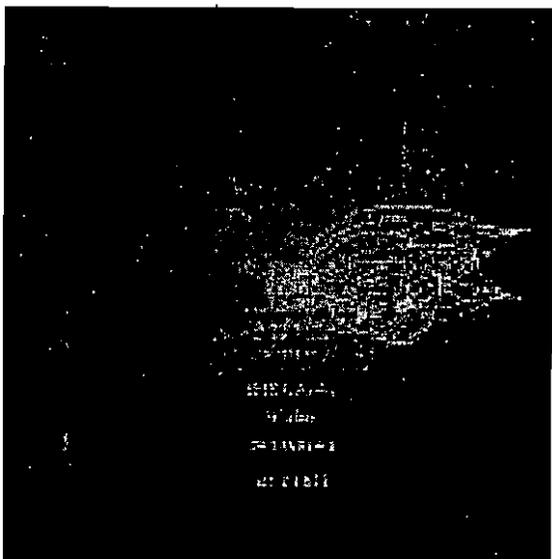


Figura 3. Niveles de interacción de genes y el ambiente.

genoma humano se establece en este momento. Todas las células de un ser humano adulto provienen de una sola célula original, que se denomina cigoto y que es el resultado de la fecundación de un óvulo por un espermatozoide. El óvulo contiene en su núcleo 23 cromosomas maternos y el espermatozoide en su núcleo los 23 cromosomas paternos. El cigoto, conteniendo un genoma propio distribuido en los 46 cromosomas, por divisiones sucesivas y diferenciación formará cada una de las células presentes en el embrión, feto, recién nacido, niño y adulto. El cigoto es diferente a cualquier otra célula del organismo humano. Para el científico, no hay duda que el cigoto tiene una estructura genética nueva, distinta a la del óvulo y del espermatozoide, distinta a la de los padres. Con ella se inicia la primera etapa del desarrollo de un nuevo organismo humano. Es un desarrollo continuo y previsible que llegará hasta la formación completa del organismo. Este desarrollo es dirigido ya en sus inicios desde el interior del cigoto. No es controlado desde afuera por la madre, sino que está determinado ya desde sus inicios por un nuevo código genético inscrito en el cigoto desde el momento de la fecundación y activo desde los primeros momentos. Se trata de un nuevo código genético diferente al del padre y de la madre, es decir una combinación genética con un programa cualitativamente nuevo de instrucciones. Es un nuevo genoma cuya estructura fundamental se mantendrá a lo largo de todo el desarrollo, que identifica al embrión unicelular como biológicamente humano y especifica su individualidad.

La Biología Celular, la Embriología y la Genética actual, nos informan que luego de fusionarse las membranas del espermatozoide con la del óvulo, comienza una serie de eventos biológicos que desencadenan el desarrollo embrionario y que comienza con una serie de interacciones entre el óvulo y el material del espermatozoide, que ingresa al citoplasma materno. Entre estas interacciones conviene señalar a las aportadas por el proteoma (conjunto de proteínas celular) materno y su efecto sobre las estructuras derivadas del espermatozoide. Entre los primeros eventos bioquímicos relacionados temporalmente con la fecundación, destacan: un gran flujo de iones hacia el óvulo (especialmente de Ca^{+2}), cambios en la carga eléctrica de la membrana del óvulo, cambios morfológicos del núcleo paterno (desintegración de la envoltura nuclear, decondensación de la cromatina), el intercambio de proteínas presentes en el ADN del núcleo paterno (protaminas) por histonas presentes en el citoplasma del óvulo, la

síntesis de ADN en cada pronúcleo materno y paterno por separado (sin ocurrencia de singamia) (Plachot M, 2000). Más aún, genes del genoma del embrión pueden comenzar a expresarse a tan sólo pocas horas de la fecundación (Ao et al, 1994). Todas estas evidencias científicas confirman que en el momento de la fecundación se inicia el funcionamiento de un organismo humano (Pearson H. 2002).

Posteriormente, alrededor de 30 horas posfecundación, ocurre la primera división del cigoto que genera los dos primeras células que se denominan blastómeros, cada una con 46 cromosomas (Figura 4). Cada blastómero tiene la potencialidad de originar un ser humano completo, como lo demuestra la ocurrencia de mellizos monocigóticos ("gemelos idénticos"). Luego, cada blastómero se divide mitóticamente de dos en dos. En el estado de 4 u 8 células, el genoma del embrión comienza a expresarse más masivamente. Al cabo de 3 días, el embrión está lleno de células (blastómeros) y semeja una mora (mórula). Al cuarto día, el embrión crece y se produce una cavidad generando un blastocisto. En el blastocisto aparecen territorios celulares comprometidos con funciones específicas. La masa celular interna del blastocisto posee las células troncales ("células madre" o *stem*) que son células pluripotenciales encargadas de producir cada una de las células de los diferentes tejidos propios del embrión humano. Al 7° día posfecundación, el embrión llega al útero donde se implanta (anida) y comienza la producción de hormonas, que detectadas en tests de laboratorio, permiten detectar clínicamente la presencia de embarazo. En ello se sustenta la definición de embarazo según la Organización Mundial de la Salud. Es importante destacar que la

mujer ha estado embarazada con un embrión en desarrollo durante 7 días, sin saberlo. En el desarrollo embrionario posterior una fecha importante es el día 14, cuando comienza a manifestarse el sistema nervioso central y el día 16, que corresponde a la gastrulación.

A pesar de que las ciencias biológicas muestran que indiscutiblemente el desarrollo de un nuevo ser humano comienza con la fecundación (Pearson H, 2002), varios países han cuestionado que la vida del embrión sea la de un nuevo ser humano o si sería o no merecedor de respeto en estas condiciones. Otros países han ido más allá e incluso afirman que el respeto a un ser humano está condicionado a su estado de desarrollo o a su capacidad de expresar sus potencialidades completamente. Por ejemplo, legalmente en Inglaterra, se considera que la naturaleza humana del embrión se adquiere a los 14 días de desarrollo, puesto que en este día comienza a manifestarse el sistema nervioso del embrión. Por ello, en Inglaterra, el embrión humano sólo es sujeto que merece respeto desde el día 14. Antes de ese día, el embrión es un "objeto" o "cosa" (llamada "preembrión") y por lo tanto sujeta a manipulación. Ello, sustenta la clonación terapéutica que acaba de aprobarse en Inglaterra (ver más adelante). La naturaleza humana no puede reducirse a un órgano específico (cerebro).

En el 2003, Smith B y B. Brogaard, sostienen que la naturaleza humana del embrión comienza en el día 16, cuando ocurre la gastrulación. No cabe duda que el embrión se anida en el día 7°, manifiesta su sistema nervioso en el día 14° y que sufre gastrulación en el día 16, como consecuencia de una secuencia ordenada y sucesiva de eventos biológicos que se iniciaron en el momento de la fecundación. Por ello, estos límites son definitivamente arbitrarios.

CLONACIÓN ARTIFICIAL EN ANIMALES

Artificialmente, la clonación ha sido posible de lograr con mayor facilidad en las plantas. De hecho, los primeros intentos de clonación artificial en plantas ya se encuentran en crónicas de los antiguos griegos. En los animales la clonación artificial ha sido técnicamente muy laboriosa y difícil. Los primeros intentos exitosos fueron realizados por el Dr. J. B. Gurdon en la década del 60 en anfibios (Gurdon JB, 1974). A partir de núcleos de células epiteliales intestinales de ranas adultas (células diferenciadas), transferidos a oocitos

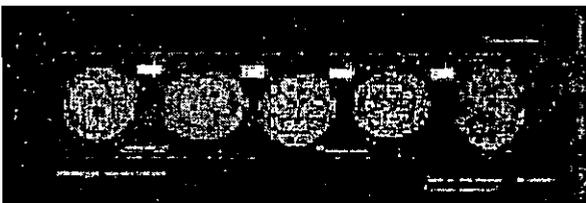


Figura 4. Esquema del desarrollo embrionario de los seres humanos. a. Cigoto (huevo fertilizado). b. Estado de dos células (1 1/2 días). c. Estado de ocho células (2 1/2 días). d. Estado de mórula (3 días). e. Estado de blastocisto (4-5 días).

de rana a los cuales se les había removido sus núcleos, Gurdon y sus colaboradores lograron obtener en algunos casos desarrollo de renacuajos y ranas adultas. Estos experimentos lograron demostrar que durante la diferenciación celular se conserva la totalidad del material genético. En la célula diferenciada del epitelio intestinal se expresan los genes comunes a todas las células y aquellos específicos intestinales (y no se expresan los genes específicos de otros tejidos, como por ejemplo, muscular). Pero en estas células intestinales diferenciadas se encuentra todo el genoma, que existía en el cigoto inicial.

También estos experimentos muestran que es posible reprogramar la información genética nuclear. Esto significa, que el citoplasma del oocito contiene señales capaces de ordenar al genoma nuclear que comience a expresarse en forma coordinada y armónica de modo similar a lo que ocurre en la diferenciación celular del desarrollo embrionario normal.

En Febrero de 1997, el Dr. Ian Willmut y su grupo de investigación en Gran Bretaña, logró producir el primer mamífero clonado a partir de una célula de un tejido adulto diferenciado: se trata de la oveja Dolly (Willmut et al, 1997). Para su producción Willmut obtuvo células de la glándula mamaria de una oveja las que puso a cultivar en el laboratorio. De otra oveja obtuvo oocitos a los que les retiró quirúrgicamente sus núcleos, y luego fusionó estos oocitos sin núcleos con las células mamarias, que se encontraban en reposo proliferativo (G0). Estas que contienen todos los cromosomas (y genes) de la oveja, aportaron el material genético para que los oocitos sin núcleos se constituyeran en cigotos y luego se desarrollaran en embriones. Los embriones cuyo desarrollo comenzó en el laboratorio, se implantaron en ovejas-madres hospederas y de más de doscientos experimentos realizados (277), nació finalmente Dolly que corresponde a un clon de la oveja dadora de las células mamarias (Figura 5). Se trata de un clon, dado que se ha obtenido un ser vivo que es una réplica de otro adulto, sin que medie reproducción sexual. No se trata de un clon "perfecto" dado que Dolly posee genes mitocondriales correspondientes a aquellos presentes en el oocito utilizado en la clonación. Dolly fue un oveja fértil, sin embargo, debido a un envejecimiento prematuro debió ser sacrificada precozmente.

Luego de Dolly, se produjo otra oveja clonada, llamada POLLY, que adicionalmente poseía un gen humano. Y, más recientemente, se ha logrado clonar

una serie de animales, tales como ratones, monos, osos pandas, etc, de modo que se ha generado un verdadero "zoo clónico". Es interesante mencionar que los monos clonados que existen se obtuvieron mediante una técnica diferente a la utilizado en caso de Dolly. Esta diferente metodología se basa en que hoy es posible separar las dos células que se producen luego de la primera división del cigoto (blastómeros) y permitir el desarrollo de cada una de ellas por separado (técnica de "mellizaje" o *twinning*). El Dr. Wolff de Oregon, USA, clonó monos mediante esta metodología, es decir clones de monos obtenidos por mellizaje de embriones de 2 hasta 8 células. Lo perturbador de esta situación es que ella sólo se dió a conocer inmediatamente después de la revelación de Dolly, siendo que la experimentación que llevó a producir estos monos debió realizarse desde hace un par de años, sin que se conociese su existencia.

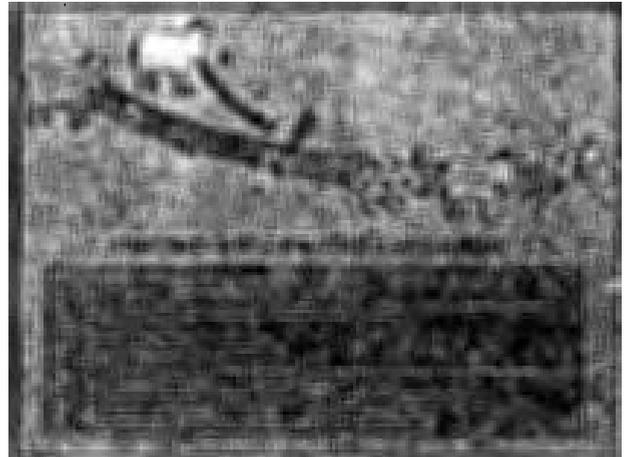


Figura 5. Procedimiento de la clonación de la oveja Dolly.

CLONACIÓN HUMANA

Cómo se mencionó anteriormente, el fenómeno de clonación natural ocurre espontáneamente en los seres humanos como es el caso de los mellizos monocigóticos ("gemelos idénticos"). El mecanismo que origina la separación de los dos primeros blastómeros a partir de un mismo cigoto y que desencadena el desarrollo embrionario de cada blastómero por separado, generando dos seres humanos, es desconocido (Scott et al, 2002). Los mellizos monocigóticos corresponden genuinamente a clones, dado que comparten la totalidad del genoma (nuclear y mitocondrial). Sin embargo, ellos no corresponden a "meras fotocopias". Si bien son genéticamente idénticos, pueden ser fenotípicamente distintos, en cuanto a características normales (peso, estatura, coeficiente intelectual, etc), como

patológicas (diabetes, hipertensión, etc). La ecuación fundamental de la Genética (Fenotipo= genotipo. + ambiente) nos permite explicar estas semejanzas y diferencias.

La primera técnica utilizada para intentar clonar seres humanos consistió en imitar lo que sucede con el caso de los mellizos monocigóticos.

a) clonación humana mediante mellizaje

La técnica llamada mellizaje (*twinning*), consiste en separar las dos células que se producen luego de la primera división del cigoto (blastómeros) y permitir el desarrollo de cada una de ellas por separado. Ello fue logrado con embriones humanos anormales por científicos de la Universidad de Washington, USA, liderados por el obstetra, Dr. R. Stillman, en 1993. Estos investigadores realizaron la separación de blastómeros a partir de cigotos triploides obtenidos por fertilización in vitro, logrando obtener desarrollo embrionario hasta mórulas (Figura 6) (Kolata, G, 1994). Posteriormente, a fines de 1998, un investigador coreano, el Dr. Lee Bo Yon, del Hospital de la Universidad de Kyonghee de Seúl, realizó mellizaje en cigotos humanos normales obtenidos por FIV, y se vio obligado a congelar los embriones obtenidos (mórulas) por la presión de la prensa internacional. Desafortunadamente, sólo existen testimonios de prensa de estos dos experimentos de clonación (New York Times, 1994 y El Mercurio, 1998). El escenario más probable de lo que hubiese sucedido si estos embriones clonados se hubiesen implantado es que ellos hubieran originado mellizos. Esta suposición se basa en la experiencia comprobada en monos, por

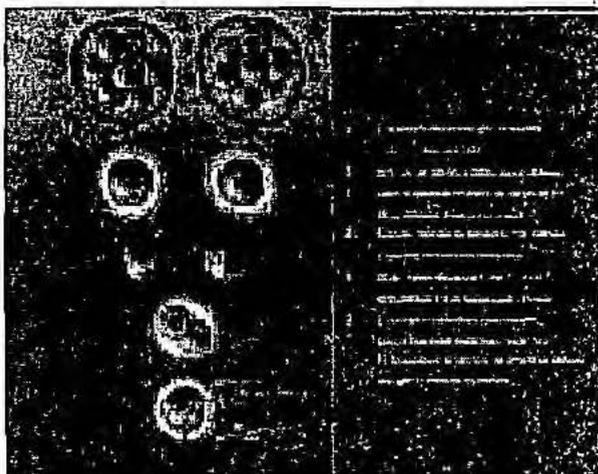


Figura 6. Clonación humana por mellizaje.

el Dr. Wolf, quien logró obtener monos clonados a partir de blastómeros provenientes de embriones de dos hasta ocho células.

b) Clonación humana mediante transferencia nuclear de células somáticas

A partir de Febrero del 2001, dos médicos especialistas en reproducción, los Drs. Savos (EE.UU.) y Antinori (Italia), han manifestado públicamente su intención de clonar seres humanos mediante transferencia nuclear, siguiendo la metodología de Dolly, con fines reproductivos, para parejas infértiles. Para ello, han sostenido en la prensa su protocolo de clonación (Figura 7).

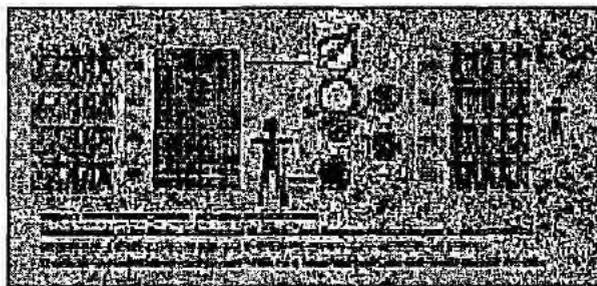


Figura 7. Estrategia de la clonación humana por transferencia nuclear.

A diferencia de lo ocurrido con los Drs. Savos y Antinori, que han sostenido sus resultados a través de la prensa, un grupo de científicos coreanos de la Universidad Nacional de Seúl, Corea, liderado por el Dr. W.S Hwang, lograron obtener embriones humanos clonados mediante transferencia nuclear de células somáticas (Hwang et al, 2004). Para ello, utilizaron cientos de oocitos de 16 mujeres voluntarias, a los que les retiraron sus núcleos y les transfirieron los núcleos de células somáticas del cúmulo oóforo obtenido de las mismas mujeres. Se realizaron más de 242 experimentos y sólo se lograron obtener 30 embriones al estado de blastocisto. De 20 de estos blastocistos se removieron quirúrgicamente las células troncales, logrando cultivarlas en forma estable en el laboratorio por muchas generaciones (Lanza & Rosenthal, 2004). Con ello, se mostró la factibilidad técnica de experimentos que previamente habían sido realizado con éxito en ratones.

Finalidad de la clonación humana

Se ha planteado la clonación humana esencialmente con dos fines: reproductivos y terapéuticos.

La clonación con fines reproductivos

Corresponde a una forma adicional de las técnicas de reproducción asistida y estaría dirigida a parejas infértiles, incluidas parejas homosexuales. Los Dres. Savos y Antinori son los obstetras que públicamente sustentan esta aproximación.

La clonación con fines terapéuticos

Intenta generar células troncales (*stem*) clonadas que sirvan para obtener células diferenciadas, que a su vez, permitan reemplazar células dañadas en variadas patologías, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, Diabetes, Infartos cardíacos, etc. (Lanza & Rosenthal, 2004). En estas patologías existe muerte de grupos celulares específicos, de modo que su tratamiento etiológico más apropiado corresponde al reemplazo de las células muertas por células vivas. Para ello, se recurre a células troncales obtenidas de embriones o de tejidos adultos para diferenciarlas a células específicas. En el caso de los embriones humanos, las células troncales aparecen en el estado de blastocisto (4-5to día de desarrollo embrionario). La extracción de estas células con la consiguiente destrucción de los embriones, permite cultivarlas y lograr su diferenciación celular en el laboratorio, siendo posible obtener neuronas, cardiocitos, miocitos, etc. (Lanza & Rosenthal, 2004) (Figura 8). En el caso específico de la clonación humana con fines terapéuticos, la idea es utilizar oocitos a los que se les debe eliminar su núcleo, transferir el núcleo de células somáticas de la persona que se intenta clonar e inducir el desarrollo embrionario hasta que aparezcan las células troncales. Esta estrategia experimental fue recientemente realizada con éxito por un grupo de investigadores coreanos (Hwang et al., 2004). Así se obtienen células troncales con un genoma nuclear idéntico al paciente que se someterá a terapia celular y así evitar rechazo inmunológico.

Consideraciones bioéticas

El siglo 21 arremete con un magnífico desarrollo científico y tecnológico, que promete que "todo" será posible (Huxley, 1930). La clonación humana es un claro ejemplo de esta tendencia.

En la actualidad desde el punto de vista técnico la clonación humana es altamente ineficiente: en los experimentos de los coreanos, se realizaron más de

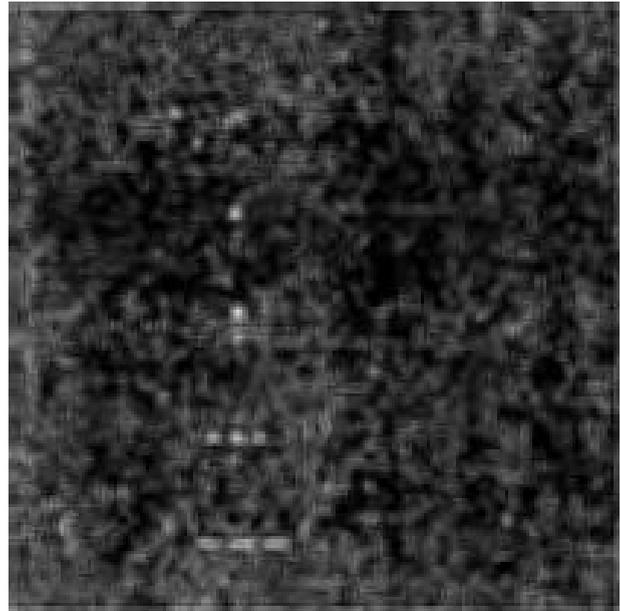


Figura 8. Diferenciación a partir de células troncales embrionarias.

240 experimentos y sólo se obtuvieron 30 embriones. Las razones de esta ineficiencia técnicas son desconocidas. Pero las cuestiones técnicas sin duda mejorarán. Sin embargo, las cuestiones éticas más fundamentales se hacen cada vez más patentes. Aquello que la tecnología ofrece, ¿es éticamente lícito realizarlo?

Nuestra sociedad tendrá que acostumbrarse a debatir este tipo de temas desde una perspectiva pluralista y sin temor al debate de las ideas.

La clonación humana ha recibido unánime rechazo por parte de toda la sociedad, fundamentalmente por razones bioéticas. De hecho en 1997, la UNESCO en su "Declaración sobre Genoma y Derechos Humanos" sostiene en el artículo 11, que "no deben permitirse prácticas que sean contrarias a la dignidad humana, como la clonación con fines reproductivos en seres humanos"

La clonación de un ser humano es éticamente reprobable por varias razones, independientes de los fines. Uno de los reparos más importantes es que la clonación viola la dignidad de la persona humana. Y la dignidad humana es un valor fundamental que atraviesa transversalmente posiciones religiosas y sociedades, como queda de manifiesto en la Declaración de la UNESCO de 1997 y 2005. La dignidad humana en la clonación se viola al convertir al clon en un producto generado por la tecnología, en contraposición a la categoría de don o "regalo" cuando se genera un ser humano por la vía natural. La clonación viola los derechos de individualidad y

autonomía de las personas al imponérselo al clon un patrimonio genético y utiliza a los seres humanos como medios y no como fines (Savulescu, 1999, *Reflexions on cloning*, 1999).

Desde la perspectiva biológica, la clonación humana atenta contra la variabilidad genética que ocurre como consecuencia de la reproducción sexual y que representa la fuente de variación que traducida en caracteres fenotípicos se ofrece a la selección natural que permite los cambios evolutivos.

Si bien afortunadamente la clonación humana con fines reproductivos es rechazada en forma casi unánime, aquella con fines terapéuticos cada vez tiene más adeptos. La llamada "clonación terapéutica" emerge como la estrategia de tratamiento etiológico para variadas afecciones comunes, desde la Enfermedad de Alzheimer, la Enfermedad de Parkinson, pasando por la Diabetes hasta llegar a infartos cardíacos, entre muchas otras afecciones.

Desde el punto de vista bioético, la clonación terapéutica no puede justificarse. Por muy loable que sea el fin (terapia), los medios no la justifican. Los seres humanos inician su desarrollo desde el momento de la fecundación, por ello los embriones ya son seres humanos en desarrollo (y no en potencia). Por ello no es justificable la producción de seres humanos mediante clonación para posteriormente destruirlos en su desarrollo para obtener un beneficio para personas que sufren graves enfermedades (cual es la obtención de células troncales *-stem-*, embrionarias para posteriormente diferenciarlas, por ej. a neuronas y sustituir tejido dañado, por ej. Enfermedad de Alzheimer). Adicionalmente, cabe recordar que la técnica de clonación en la actualidad es muy ineficiente, de modo que muchos seres humanos en la etapa embrionaria morirán y sólo algunos pocos podrán sobrevivir para posteriormente destruirlos. Existen partidarios de la clonación terapéutica que justifican utilizar embriones de "desecho" de los procedimientos de fertilización *in vitro*, los llamados "embriones huérfanos". Muchos de ellos terminarán literalmente en la basura (como ya ocurrió hace algunos años, en Inglaterra con más de tres mil embriones), por lo tanto, y en vez de terminar en la basura ¿podrían utilizarse para obtener células troncales? "Nuevamente el fin, ¿justifica los medios?" No es éticamente aceptable destruir estos seres humanos en estado embrionario independiente de los fines.

En la actualidad ya existen alternativas para obtener células troncales para intentar terapia

celular. Estas células troncales se pueden encontrar en los tejidos adultos (como médula ósea y otros) y en el cordón umbilical. Un reciente reporte indica que científicos lograron aislar células troncales humanas de cordón umbilical y exitosamente pudieron diferenciarlas hacia células nerviosas maduras y funcionales (Newman et al, 2004). Por otra parte, células troncales obtenidas de tejidos adultos también poseen un gran potencial terapéutico (Rice & Scolding, 2004). Este hallazgo es sumamente oportuno porque demuestra que no sólo los embriones humanos son fuente de células troncales y abre una luz de esperanza para las personas afectadas por enfermedades devastadoras. Es de esperar que se siga desarrollando esta línea de investigación (obtención de células troncales de tejidos adultos o cordones umbilicales) para evitar el uso de embriones humanos, cuya disponibilidad aparece como la más "promisoria" fuente de estas células, lo que éticamente es reprochable.

Aspectos legales

En Gran Bretaña en agosto de 2004, el parlamento inglés legisló aprobando la clonación humana con fines terapéuticos. Esta decisión ha causado un gran impacto internacional. Sin embargo, ella era esperada, dado que en este país anteriormente ya se había legislado a favor de que la vida de los seres humanos comenzaba a partir del día 14 del desarrollo embrionario. Por ello, la utilización de células troncales obtenidas de embriones clonados, que aparecen en el blastocisto (antes de los 14 días) parecía como esperable.

En Chile, un proyecto de ley que intenta legislar sobre clonación humana, en la actualidad está siendo debatido en el Parlamento chileno. La clonación humana con fines reproductivos ha recibido un unánime rechazo, sin embargo, la clonación humana con fines terapéuticos ha motivado una considerable discusión. La Comisión de Salud de la Cámara de Diputados finalmente votó por prohibir la clonación terapéutica que involucre utilización de células troncales embrionarias, dado que se optó por la alternativa de proteger la vida de los seres humanos desde el momento de la concepción.

Consideraciones Finales

Si bien los grandes avances científicos en la esfera biológica y genética han invadido el terreno de la intimidad de los seres humanos, obligando a

la sociedad a plantearse preguntas básicas acerca de nuestra naturaleza, no es menos cierto que estos avances han contribuido a confirmar la individualidad de los seres humanos, materia de discusión permanente en el ámbito filosófico y religioso.

Los seres humanos estamos llamados a nacer por la gracia de Dios, en el seno de una familia y como consecuencia del amor entre un hombre y una mujer. La clonación de seres humanos convierte a los clones en productos, violando la dignidad que todo ser humano debe poseer, por lo que es intrínsecamente inmoral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ao A. et al. Transcription of paternal Y-linked genes in the human zygote as early as the pronucleate stage. *Zygote* 1994; 2:281-287.
2. Bentley D. Genomes for Medicine. *Nature* 2004; 429: 440-450.
3. El Mercurio, 18 de Diciembre de 1998, pp A5.
4. Gurdon JB. The Control of gene expression in animal development (Clarendon Press, Oxford, England), 1974.
5. Huxley, A. Un mundo feliz. (Ed. Porrúa, México), 1997.
6. Hwang WS, et. Al. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 2004; 303(5664): 1669-1674.
7. Savulescu J. Should we clone humans beings? Cloning as a source of tissues for transplantation. *J Med Ethics* 1999; 25: 87-95.
8. Kolata, G. Scientist clones human embryos, and creates an ethical challenge. *New York Times* 1993; Nov 24, pp 22.
9. Lanza R. & N. Rosenthal. The stem cell challenge. *Sci. Amer.* 93-99, June 2004-09-04
10. Newman MB, et al. Transplantation of human umbilical cord blood cells in the repair of CNS diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4(2):121-130.
11. Pearson H. et al. Your destiny, from day one. *Nature* 2002; 418:14-15.
12. Plachot M. Fertilization. *Hum Reprod* 2000; 15(Suppl. 4): 19-30.
13. Reflexions on cloning. Pontificia Academia pro Vita. (Libreria Editrice Vaticana, Ciudad del Vaticano), 1999.
14. Rice CM & Scolding NJ. Adult stem cells- Reprogramming neurological repair? *Lancet* 2004; 364(9429):193- 199.
15. Scott L, et. al. The origin of monozygotic twinning. *Reprod Biomed Online* 2002; 5(3):276-284.
16. Smith B, Brogaard B. Sixteen Days *J. Med. Philos* 2003; 28: 45-78.
17. UNESCO. Declaración sobre genoma y derechos humanos. Noviembre 1997.
18. Wilmut I, et Al. Viable offspring derived from foetal and adult mammalian cells. *Nature* 1977; 385: 811-813.

MEDICINA REGENERATIVA MEDIANTE EL USO DE LAS CÉLULAS STEM: UN DEBATE CIENTÍFICO Y BIOÉTICO

Manuel J. Santos, Médico genetista y Doctor en Ciencias, Profesor de Genética y Bioética, Pontificia Universidad Católica de Chile

Artes y Letras, El Mercurio, Domingo 11 de Diciembre de 2005

En los últimos meses, se ha publicitado profusamente que importantes afecciones tales como la Enfermedad de Alzheimer, el mal de Parkinson, la Diabetes y hasta el infarto del corazón podrían ser susceptibles de un nuevo tipo de tratamiento, más racional y etiológico, mediante el uso de células stem (o troncales o estaminales). Básicamente, la idea es reemplazar aquellas células muertas que se producen por la enfermedad de base, por nuevas células vivas: neuronas en el caso de Alzheimer y Parkinson; células de páncreas en Diabetes y células cardíacas en el infarto del corazón. Para esta llamada Medicina Regenerativa, se plantea utilizar células stem, que son células indiferenciadas las cuales poseen la propiedad de transformarse en muchos tipos celulares específicos (Fig.1), de modo que se trata de células pluripotenciales.

Cuando se dividen por mitosis, las células stem originan dos tipos de células hijas diferentes: una que mantiene la propiedad stem, es decir capacidad de autorenovación, y la otra que pierde la propiedad stem y se "compromete" a diferenciarse a tipos celulares específicos. Esta última característica es la que los científicos están aprovechando para lograr artificialmente la diferenciación en el laboratorio, con el fin de contar con células diferenciadas para la terapia celular. Experimentos realizados en animales han resultado básicamente exitosos.

FUENTES DE CÉLULAS STEM

Las células stem pueden obtenerse de diversas fuentes: embriones, cordón umbilical y diversos tejidos adultos entre los que destaca la médula ósea. La utilización de las células stem de origen embrionario ha traído una fuerte discusión a nivel bioético en muchos países y, particularmente en Chile, donde acaba de aprobarse un proyecto de ley que explícitamente prohíbe el uso de células stem embrionarias.

1.- Células stem embrionarias

Todas las células de un ser humano adulto provienen de una sola célula original, que se denomina cigoto y que es el resultado de la fecundación de un óvulo por un espermatozoide. En el momento de la fecundación comienza el desarrollo de un ser humano. El óvulo contiene en su núcleo 23 cromosomas maternos y el espermatozoide en su núcleo los 23 cromosomas paternos, por tanto el genoma humano distribuido en 46 cromosomas se establece en la fecundación. En este genoma existen alrededor de 25 mil genes que interactuando entre sí y con el ambiente son responsables de las características biológicas de los seres humanos. (información del genoma humanos en http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/liome.shtml). El cigoto, por divisiones sucesivas y diferenciación formará cada una de las células presentes en el embrión, feto, recién nacido, niño y adulto, por tanto se trata de una célula totipotencial. Con el cigoto se inicia la primera etapa del desarrollo de un nuevo organismo humano. Es un desarrollo continuo y previsible que llegará hasta la formación completa del organismo. Este desarrollo es dirigido ya en sus inicios desde el interior del cigoto. No es controlado desde afuera por la madre, sino que está determinado por un nuevo código genético inscrito en el cigoto desde el momento de la fecundación y activo desde los primeros momentos. Se trata de un nuevo código genético diferente al del padre y de la madre, es decir una combinación genética con un programa cualitativamente nuevo de instrucciones. Es un nuevo genoma cuya estructura fundamental se mantendrá a lo largo de todo el desarrollo, que identifica al embrión unicelular como biológicamente humano y especifica su individualidad. La Biología ha establecido que luego de fusionarse las membranas del espermatozoide con la del óvulo, comienza una serie de eventos biológicos que desencadenan el

desarrollo embrionario. Así es como genes del genoma del embrión pueden comenzar a expresarse a tan sólo pocas horas de la fecundación.

Alrededor de 30 horas postfecundación, ocurre la primera división del cigoto que genera los dos primeras células que se denominan blastómeros. Cada blastómero tiene la potencialidad de originar un ser humano completo, como lo demuestra la ocurrencia de mellizos monocigóticos ("gemelos idénticos"), es decir se trata de células totipotenciales. Luego, cada blastómero se divide mitóticamente de dos en dos. Al cabo de 3 días, el embrión está lleno de células (blastómeros) y semeja una mora (mórula). Al cuarto día, el embrión crece y se produce una cavidad generando un blastocisto. En el blastocisto aparecen territorios celulares comprometidos con funciones específicas. La masa celular interna del blastocisto posee las células stem, que son células pluripotenciales encargadas de producir cada una de las células de los diferentes tejidos propios del embrión humano, incluido el tejido germinal (Fig 2). (Hay científicos que plantean la existencia de células stem multipotenciales que pueden diferenciarse a cualquier tejido excepto el germinal). En las células pluripotenciales se expresan factores (de transcripción) que controlan la expresión de genes, los que finalmente determinan la diferenciación celular. Al 7º día postfecundación, el embrión llega al útero donde se implanta (ánida) y comienza la producción de hormonas, que detectadas en tests de laboratorio, permiten conocer clínicamente la presencia de embarazo. En ello se sustenta la definición de embarazo según la Organización Mundial de la Salud. Es importante destacar que una mujer ha estado embarazada con un embrión en desarrollo durante 7 días, sin saberlo. En el desarrollo embrionario posterior una fecha importante es el día 14, cuando comienza a manifestarse el sistema nervioso central y se pierde la posibilidad de divisibilidad del embrión.

La extracción de las células stem de embriones humanos obtenidos por fertilización in vitro con la consiguiente destrucción de los embriones, permite cultivarlas y lograr su diferenciación celular en el laboratorio, siendo posible obtener neuronas, células musculares cardíacas y esqueléticas, células del hueso y cartílago, etc. Estas células diferenciadas en el laboratorio (in vitro) son aquellas que pueden eventualmente utilizarse en medicina regenerativa para reemplazar células dañadas en variadas patologías, tales como Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Parkinson, Diabetes, Infartos cardíacos, etc. Ello ya se ha logrado en animales de experimentación. Para evitar crear nuevos embriones como fuente de células stem, se ha pensado en utilizar los embriones sobrantes de la fertilización in vitro y que permanecen congelados a 180 ° bajo cero en nitrógeno líquido. Muchos de estos embriones supernumerarios terminarán literalmente en la basura, como ya ocurrió hace algún tiempo en Inglaterra. En ello, se sustentan los investigadores que proponen el uso de estos embriones para la obtención de células stem.

El uso de células stem en Medicina Regenerativa, ya sea provenientes de embriones recientemente creados o congelados, puede acarrear riesgos por posibles rechazos inmunológicos. Para ello se ha sugerido realizar **clonación con fines terapéuticos** mediante transferencia nuclear, que intenta generar células stem clonadas de la siguiente forma: a oocitos se les debe eliminar su núcleo, posteriormente se transfiere el núcleo de células somáticas de la persona que se intenta clonar (por ejemplo, célula de la piel) y finalmente, se induce el desarrollo embrionario hasta que aparezcan las células troncales (al estado de blastocisto). El núcleo de la célula somática diferenciada (piel) y transferida al oocito, sufre un fenómeno llamado Reprogramación nuclear asistida por el citoplasma del oocito. Es decir, factores presentes en el oocito actúan sobre el genoma "desdiferenciando" la célula de la piel, volviéndola a un estado indiferenciado, que posteriormente sufre el fenómeno de diferenciación embrionaria normal (Fig. 3c). Esta estrategia experimental, aunque poco eficiente, ya que se requieren cientos de experimentos, fue recientemente realizada con éxito por un grupo de investigadores coreanos (liderados por el Dr. Hwang). Así se obtienen células stem con un genoma nuclear idéntico al paciente que se someterá a terapia celular, evitando un eventual rechazo inmunológico. Sin embargo, cabe señalar que este tipo de clonación no es completa, dado que se utilizan oocitos provenientes de ovodonación y en el citoplasma de los oocitos existen determinantes genéticos (genes) en mitocondrias, por lo que las células stem obtenidas por clonación terapéutica no son cien por ciento genéticamente idénticas a la persona que se está clonando.

2.- Células stem umbilicales. En el cordón umbilical existen abundantes células stem con un buen potencial de diferenciación y con una menor carga inmunogénica que otras células stem adultas. En la sangre del cordón existen células stem hematopoyéticas y mesenquimáticas. Las primeras, también llamados "precursores hematopoiéticos", permiten obtener los diferentes tipos de células hematológicas. Estas células ya se han utilizado clínicamente con mucho éxito, en Chile y en el resto del mundo, en tratamientos médicos para diversas patologías tales como leucemias y algunas afecciones genéticas. Por otro lado, las células stem mesenquimáticas, pueden diferenciarse a distintos tipos de células tales como células del tejido adiposo, cartílago, hueso, músculo, etc. Actualmente, la sangre de cordón se almacena congelada en Bancos públicos y privados. En Chile sólo existen Bancos privados.

3.- Células stem adultas. Los diversos tejidos adultos poseen una pequeña proporción de células stem. Estas corresponden a células multipotentes y comprometidas para la diferenciación específica de los tejidos en que se encuentran. Uno de los tejidos más utilizados como fuente de células stem adultas corresponde a la Médula ósea. En ella, existen células multipotentes de la línea hematopoyética y mesenquimática. Estas últimas pueden diferenciarse en varios tipos celulares: células adiposas, células del hueso, células musculares cardíacas y esqueléticas, etc.

Utilizando células stem de médula ósea adultas, se han logrado promisorios resultados en ensayos terapéuticos en animales de experimentación para tratar diversos modelos biológicos de patologías humanas, tales como infarto del corazón, daño de médula espinal, etc. También se han obtenido células stem adultas a partir de tejido adiposo y tejido vascular entre otros

Problemas del uso de células stem en terapia celular. En los ensayos realizados en animales de experimentación se han observado varias complicaciones, que obligan a replantearse su eventual utilidad en los seres humanos. Los principales problemas observados son la formación de tumores, la fusión con células del tejido huésped, la desdiferenciación, etc. La formación de tumores (cánceres) es significativamente mayor al utilizar células stem embrionarias.

Aspectos bioéticos del uso de células stem embrionarias

A pesar de que las ciencias biológicas muestran que indiscutiblemente el desarrollo de un nuevo ser humano comienza con la fecundación, varios países han cuestionado que la vida del embrión sea la de un nuevo ser humano o si sería o no merecedor de respeto en estas condiciones. Otros países han ido más allá e incluso afirman que el respeto a un ser humano está condicionado a su estado de desarrollo o a su capacidad de expresar sus potencialidades. Por ejemplo, legalmente en Inglaterra, se considera que la naturaleza humana del embrión se adquiere a los 14 días de desarrollo, puesto que en este día comienza a manifestarse el sistema nervioso del embrión y se pierde la eventual divisibilidad del embrión. Por ello, en Inglaterra, el embrión humano sólo es sujeto que merece respeto desde el día 14. Antes de ese día, el embrión es un "objeto" o "cosa" (llamada "preembrión") y por lo tanto sujeta a manipulación. Ello sustenta la clonación terapéutica que fue aprobada en Inglaterra. No obstante, la naturaleza humana no puede reducirse a un órgano específico (cerebro). No cabe duda que el embrión se anida en el día 7°, manifiesta su sistema nervioso en el día 14° y que sufre gastrulación en el día 16, como consecuencia de una secuencia ordenada y sucesiva de eventos biológicos que se iniciaron en el momento de la fecundación. Por ello, estos límites son definitivamente arbitrarios.

En la actualidad, existen diferentes posiciones frente al estatus moral del embrión. Una de ellas sostiene que el embrión es un ser humano sujeto de respeto desde la concepción y por tanto es inmoral su destrucción para la obtención de células madre. Otra, como la sostenida en Inglaterra es considerar al embrión como sujeto de respeto sólo después del día 14, por tanto considera a los embriones tempranos como simple acúmulo de células y por tanto, manipulable para la extracción de las células stem. Finalmente, una tercera posición considera a los embriones humanos como poseedores de un estatus moral único, que acepta que se obtengan células stem de ellos como una forma de aliviar el sufrimiento. Por último, también se ha sostenido que sería ético utilizar los embriones congelados, que quedan como

consecuencia de la fertilización in Vitro. Sin embargo, por muy loable que sea la finalidad de intentar curar enfermedades mediante el uso de células stem de estos embriones congelados, ello no justifica la destrucción de estos seres humanos indefensos.

Aspectos legales

En Chile, un proyecto de ley que intenta legislar sobre la clonación humana, fue recientemente aprobado por el Parlamento chileno. El proyecto prohíbe la clonación terapéutica que involucre utilización de células stem embrionarias, dado que se optó por la alternativa de proteger la vida de los seres humanos desde el momento de la concepción. Sin embargo, lamentablemente, el proyecto fue vetado por el ejecutivo, precisamente por ello. Más aún este proyecto prohíbe explícitamente la destrucción de los embriones para obtener células stem.

Nuevos métodos alternativos de obtención de células stem embrionarias:

Con el fin de sobrepasar los problemas bioéticos y políticos del uso de células stem a partir de embriones humanos, se están desarrollando nuevos métodos para obtenerlas, que ya han tenido promisorios resultados en animales de experimentación:

1.- Obtención de células stem a partir de un sólo blastómero. Para ello se extrae un blastómero de embriones al estado de 8 células (mediante un procedimiento previamente utilizado para realizar diagnóstico de afecciones genéticas de los embriones humanos antes de implantarlos). El blastómero así obtenido se cultiva en el laboratorio en presencia de otras células stem ya establecidas, y así puede proliferar y generar su propia línea celular (fig. 3b).

2.- Obtención de células stem pluripotentes donante-específica mediante transferencia nuclear. Para ello, se transfiere el núcleo de una célula somática del donante a un oocito al que se le ha removido su propio núcleo, y se espera que ocurra la reprogramación nuclear del genoma del donante, asistido por el citoplasma del oocito, obteniéndose un blastocisto denominado "embroide" (para diferenciarlo de un blastocisto normal). Del blastocisto embroide se extraen las células stem (Fig 3c). Uno de los problemas de esta tecnología es el eventual uso de genomas de personas enfermas, de modo que se generarían células stem también enfermas. Recientemente un grupo de investigadores coreanos logró poner a punto esta tecnología para personas enfermas.

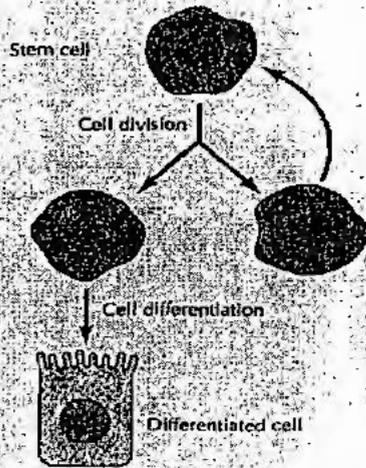
3.- Obtención de células stem pluripotentes mediante Transferencia nuclear alternativa. Este método requiere de manipulación genética antes de realizar la transferencia nuclear. En ratones, el gen *cdx2* es importante para establecer el trofoectodermo (capa celular que rodea al blastocisto), de modo que su supresión impide la implantación del embrión en el útero. Los autores diseñaron un método para controlar la expresión del gen *cdx2* en diferentes etapas del desarrollo embrionario. Para ello, inyectaron un gen que inhibe la expresión del gen *cdx2*. Una vez obtenidas las células stem del blastocisto, se activa el inhibidor que impide la implantación (Fig. 3d). Otra forma de obtener el mismo efecto es bloqueando otro gen (como el gen *nanog*, que codifica para un factor de transcripción). Los embriones obtenidos mediante esta metodología se denominan "artefactos biológicos no-viables", que según algunos autores, poseerían un status moral diferente, ya que no tendrían el potencial de desarrollarse en una forma humana. Esta tecnología posee además una serie de problemas como consecuencia del efecto de adición o eliminación de genes

4.- Obtención de células stem pluripotentes evitando utilizar óvulos. Se trata de una posibilidad teórica: si se lograra descubrir el mecanismo mediante el cual el citoplasma del oocito reprograma el genoma de una célula somática diferenciada, entonces se podría aplicar este procedimiento para convertir células adultas diferenciadas en células stem, sin pasar por el óvulo ni desarrollo embrionario. Ya existen experimentos preliminares con animales de experimentación.

La medicina regenerativa mediante el uso de células stem embrionarias no sólo representa un desafío científico, sino que una encrucijada bioética, que obliga a la sociedad a reflexionar acerca de cuándo comienza la vida de un ser humano y si ella es manipulable.

Figura N° 1

Figure 14.42
Stem cell proliferation Stem cells divide to form one daughter cell that remains a stem cell and a second that differentiates (e.g., to an intestinal epithelial cell).



Libro: Korf: Biology of the Cell

Figura N° 2

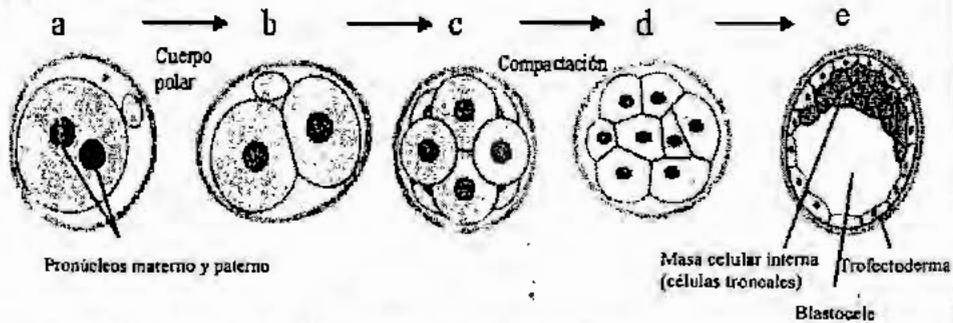
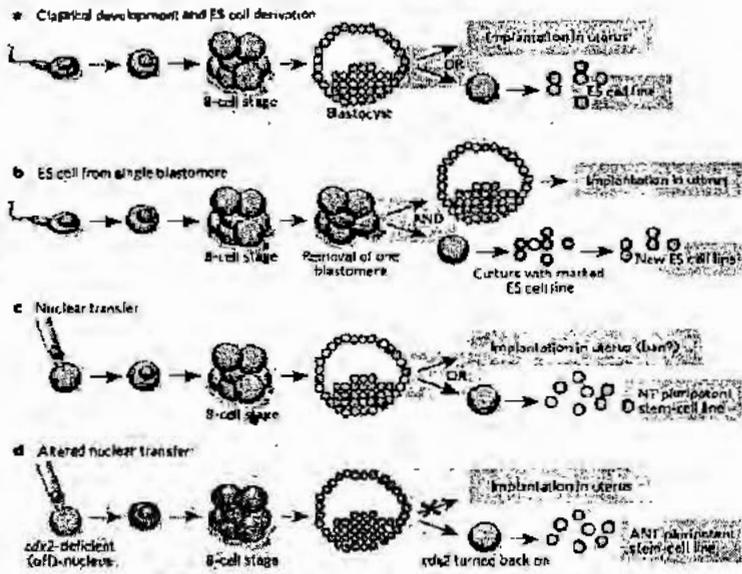


Fig. 4.- Esquema del desarrollo embrionario de los seres humanos. a. Cigoto (huevo fertilizado), b. Estado de 2 células (1 ½ días), c. Estado de 8 células (2 ½ días), d. Estado de mórula (3 días) y e. Estado de blastocisto (4 días).

LIBRO: Alberts. Molecular Biology of the Cell

Figura N° 3



Nature on line
16 Oct. 2005

Figure 1 | Producing pluripotent stem-cell lines. a, The classical derivation of embryonic stem (ES) cells destroys the embryo from which they are derived. b, Lanza and colleagues² have used a modified method that does not compromise the embryo, but is not donor-specific. c, Donor-specific pluripotent stem cells can be made using nuclear transfer (NT) techniques. d, An altered nuclear transfer (ANT) method developed by Meissner and Jaenisch³ blocks expression of the *cdx2* gene until the blastocyst stage, making it unable to implant.

genoma

di Giovanni Caporaso

Il libro di Giovanni Caporaso, *Il genoma*, è un'opera di divulgazione scientifica che si propone di spiegare in modo semplice e chiaro i concetti fondamentali della genetica e della genomica. L'autore, che è un esperto di biologia molecolare, affronta in modo sistematico i temi della struttura del DNA, della replicazione, della trascrizione e della traduzione, nonché delle tecniche di sequenziamento e di analisi genomica. Il libro è diviso in capitoli che trattano di argomenti come la genetica classica, la genetica molecolare, la genomica e l'evoluzione. È un'opera che può essere utile sia per gli studenti di biologia che per i lettori interessati alle ultime scoperte in questo campo.

PENSAR EL GENOMA HUMANO

la ética del gen

PROF. ANDRÉS ARTEAGA MANIEU



La ciencia es una conquista de la historia y de la humanidad. Por mucho tiempo el hombre se movió por explicaciones míticas (que no dejan de ser importantes pues el mito "da que pensar" y no es una forma de ocultar lo real, sino un acceso diferente al del *logos científico*). Hoy se accede a lo real fundamentalmente por la razón y por la ciencia, que permiten conocer, transformar y dominar el mundo. Y no hay duda que esto es un progreso para la vida humana. Las más grandes transformaciones de nuestro tiempo se deben a la ciencia y esto afecta profundamente al hombre. A su vez, esta forma de ver el mundo no elimina otras perspectivas legítimas, como la poesía, la filosofía y la religión. Se puede afirmar que el método de la ciencia le permite explicar, comprender y predecir los fenómenos.

Explica *reduciendo* el fenómeno a sus causas (y allí está también su *limitación*). De los hechos pasa a una explicación mediante una hipótesis, una deducción y procesos de contrastación de los resultados. Se buscan hipótesis, leyes, teorías y modelos. En esta perspectiva, la ciencia toca lo real desde un ángulo particular, no totalizante. Ciencia no es realidad sino una forma importante y útil de acceder a lo real (¿a todo lo real?). Aunque va más allá del sentido común del saber vulgar, es más objetiva y prolonga los sentidos mediante instrumentos, una técnica operatoria y una medida matemática.

Aquello que parecía un sueño es hoy una realidad. El hombre, después de conquistar el mundo exterior, se prepara a la conquista del mundo interior; estamos en un momento tal vez más trascendental que el del nacimiento de la ciencia mediante los descubrimientos de la física. Muchas situaciones nuevas resultan inéditas, sin que las reflexiones y criterios anteriores parezcan suficientes para dar una respuesta a los interrogantes que plantean. Se trata de un nuevo poder que reporta grandes beneficios a la humanidad, y como tal se puede convertir también en una amenaza. La preocu-

ES NECESARIA UNA GEN-ÉTICA,
ES DECIR UNA ÉTICA DEL GEN,
ACERCA DE LAS CONSECUENCIAS
HUMANAS, ECOLÓGICAS, ECONÓ-
MICAS, POLÍTICAS Y SOCIALES
QUE PUEDEN SEGUIRSE DE LA
MANIPULACIÓN GENÉTICA.

pación ética se hace indispensable y es inextirpable de la actividad humana. El ser humano necesita de criterios que estructuren su conducta y su forma de actuar. El fenómeno del pluralismo hace difícil ponerse de acuerdo en la valoración de las conductas. Pero hay tres caminos, el legal (político), el ético y el moral. El legal supone un acuerdo de mínimos para el resguardo de los derechos de todos. El ético implica una reflexión profunda del ser y quehacer humano, es una razón que vive en comunidad. El moral involucra las creencias religiosas, los axiomas y paradigmas que sustentan las posiciones éticas y jurídicas en definitiva. Por esto mismo la importancia de lo moral está en ser sustrato de todas las reflexiones. Todo presupuesto no pensado es ideológico. Incluso esto es válido para la fe, que puede convertirse en ideología cuando no es pensada.

LA CIENCIA APLICADA A LA biología humana

En el último decenio la biología ha logrado progresos extraordinarios en el campo de la genética y de la inmunología, desarrollos que han tenido un fuerte impacto en la vida humana, la agricultura, la industria. Los avances en biología molecular han permitido la investigación de las estructuras genéticas y de los mecanismos de transmisión del patrimonio genético. Así sucede con el Proyecto Genoma Humano, ya formulado en 1985 y realizado desde 1990 hasta hoy para secuenciar, localizar y mapear la información genética del ser humano. A un altísimo costo utiliza un pequeño porcentaje de la inversión (un 3%) para estudiar los aspectos éticos y jurídicos involucrados.

Frente a estos avances hay diversas reacciones culturales. Unas de alarma y preocupación, otras de optimismo. Los que se alarman muchas veces hacen una analogía con las aplicaciones de la energía nuclear y no quisieran hacer presiones en el futuro para la cancelación de experiencias genéticas que pongan en peligro remoto o cercano a la humanidad entera. Frente a estos posibles o actuales riesgos deshumanizantes, hay los que piensan que la superación de

UN ADECUADO DIÁLOGO ENTRE
 FE-CIENCIAS EXIGE DE LA
 REFLEXIÓN FILOSÓFICA COMO
 MEDIACIÓN. Y ALLÍ SE UBICA
 EL LUGAR DE LA ÉTICA. LA
 PREOCUPACIÓN ÉTICA SE HACE
 INDISPENSABLE.

los límites de la ciencia, basada en la libertad y autonomía de la ciencia, puede traer enormes beneficios a la humanidad. Así los polos de la discusión están entre la libertad y la normatividad de la investigación aplicada al hombre. Esto supone el necesario diálogo entre la comunidad científica y la opinión pública y con el mundo cultural, político y religioso.

El método experimental aplicado inicialmente a la física hoy se aplica al mundo interior humano. Las consecuencias son enormes y ya están a la vista. Ante el peligro del olvido (o traición) de las motivaciones de la ciencia, de buscar el bien del hombre, por la tendencia reductiva de la biología (muy común), se han dado pasos importantes. Desde hace ya muchos años se elaboran criterios éticos por parte de laboratorios y clínicas que toman precauciones ambientales, evitando riesgos para animales y seres humanos. Algunos son de carácter jurídico, pero tienen motivaciones éticas. Así nacen los comités éticos y una abundante literatura que reseña las discusiones al respecto. No es posible avanzar en este campo sin las oportunas reflexiones sobre la vida humana. Un adecuado diálogo entre fe-ciencias exige de la reflexión filosófica como mediación. Y allí se ubica el lugar de la ética. La preocupación ética se hace indispensable.

ASPECTOS ÉTICOS

en juego

Me parece que se pueden considerar dos como los más importantes. La *dignidad única del ser humano y la originalidad específica de la transmisión de la vida*, por una parte. El límite de la intervención médica y biológica en la vida humana, por otra. Para ello es clave la opción que se tome respecto del hombre como ser personal, inserto en una comunidad de personas (dimensión social), y sobre el sentido de su actividad. Es importante que se discuta abiertamente, que se puedan explicar los conceptos de persona y de sentido de la actividad humana que las técnicas suponen. De allí se podrán sacar luces para armonizar la libertad de investigación, la autonomía de la ciencia y el bien del hombre en una perspectiva de pluralismo cultural. Los peligros de una técnica manipuladora se superan cuando hay una ciencia con conciencia, es decir una ciencia responsable y plenamente humana. Así, el proyecto Genoma no sólo es complejo en su dimensión científica sino también en su dimensión ética.

El progreso de las técnicas biomédicas conlleva nuevos poderes sobre la vida humana; junto con el poder va la responsabilidad; y tal responsabilidad debe ser guiada por el respeto a la vida humana. Es necesaria una *gen-ética*, es decir una ética del gen, acerca de las consecuencias humanas, ecológicas, económicas, políticas y sociales que pueden seguirse de la manipulación genética. La ética debe hacernos sensibles a las manipulaciones, pues la investigación científica, por su método, tiende a simplificar la realidad. La ética nos recuerda la complejidad de la realidad. Esta tiene una función iluminadora y crítica también de los miedos irracionales que paralizan la investigación, recuerda la humildad y provisionalidad de toda ciencia. La persona humana es un sujeto, no puro objeto: el hombre es responsable de la creación.

Estas reflexiones me animan a sacar en limpio los enunciados de algunas convicciones fundamentales: la necesidad de una ciencia responsable, que además de pedir libertad y autonomía de investigación se haga responsable de sus consecuencias y las prevea. La necesidad de un diálogo interdisciplinar entre las diversas ciencias. Entre las ciencias, la filosofía y las corrientes de pensamiento y de vida religiosa. Buscar siempre el bien de la persona humana, en cuanto persona y como comunidad humana, especialmente de los más pequeños y desvalidos, de los inocentes, de los enfermos



y no-nacidos. La urgencia de prevenir desastres incalculables y nuevas formas de opresión y marginación, fruto de intereses mezquinos y falta de respeto a la dignidad de las personas. Finalmente, la convicción de que la fe abre la mente, no la deja encerrarse en sus propios prejuicios. Permite ver más lejos.

Quisiera mencionar, por último, cuatro aspectos de la fe cristiana que me parecen fundamentales en la iluminación de las cuestiones éticas de la investigación y experimentación genética humana: el concepto de creación, la originalidad de la criatura humana en el cosmos, el valor del trabajo humano y la manera de ver el futuro del cristiano, la esperanza.

a. El concepto de creación: Según el primer artículo del símbolo de la fe cristiana, Dios lo ha creado todo de la nada, desde el principio del mundo. Es decir el mundo es totalmente distinto de Dios, y por otra parte el mundo depende totalmente de Dios. La noción de creación es original y única frente a todo panteísmo que confunde Dios y el mundo y a todo dualismo que aparta a Dios del mundo. Esto ha permitido hacer ciencia, pues el mundo no es divino. Pero una ciencia adecuada debe respetar el profundo compromiso que Dios tiene con el mundo. Dios es un Dios Providente y Bueno. El ser creado es auténtico, tiene leyes propias que debemos respetar y a la vez tiene su ser recibi-

do, no se funda en sí mismo. Nuestro mundo es excéntrico, no tiene en sí su centro sino en Dios. Por tanto, sin el Creador la criatura se esfuma, y por el olvido del Creador la criatura queda oscurecida, como lo recuerda el Concilio Vaticano II.

- b. La originalidad de la criatura humana en el cosmos: El ser humano ha sido creado a imagen y semejanza de Dios, uno en alma y cuerpo. Por su inteligencia y libertad puede conocer y amar a su Creador, no es algo sino alguien. Dios ha creado todo para el hombre, pero éste ha sido creado para amar y servir a Dios y ofrecerle toda la creación. El cuerpo humano participa de la dignidad de la imagen y está animado por el alma espiritual.
- c. El valor del trabajo humano: el ser humano, hombre y mujer, es un ser creativo, ha sido creado creador, colabora con llevar la creación a plenitud, pues Jesucristo es quien ha revelado el destino final de todo, la gloria del Padre.

d. La manera de ver el futuro del cristiano, la esperanza: Todo se orienta hacia Cristo, es Él quien recapitulará todas las cosas. El futuro está animado por la esperanza, Jesucristo es nuestra esperanza.

Estos aspectos de la fe deben ser explicitados en las categorías que el hombre y la mujer de hoy comprenden y animar el diálogo con la ciencia y específicamente con los adelantos de

la genética. El camino es tan largo como arduo, llevará toda la primera parte del nuevo milenio que se acerca. Estamos a un paso de controlar nuestra propia evolución. La fe cristiana puede ser de gran ayuda para acompañar y orientar con humildad y modestia, con paciencia, estos momentos. Sobre todo liberando de los miedos irracionales y de las absurdas manipulaciones de las personas. Como lo dijo el Santo Padre, Juan Pablo II, en el centenario de Mendel en 1984, la calidad de los efectos de la investigación y experimentación genética parecen no tanto depender de la ciencia sino de la *subiduría humana*. La Iglesia, experta en humanidad, Madre y Maestra, puede y debe ser ese aporte, tiene *subiduría* para acompañar al hombre en esta nueva etapa de su historia. No hay duda de la importancia de los genes, pero mientras más sabemos de ellos parece que más se revela la importancia de la libertad. La genética no nos libera de la responsabilidad.

Andrés Arteaga Manfau, ordenado sacerdote en 1986, bachiller en Teología en 1985, licenciado en Teología en 1990 y doctorado en Teología por la Pontificia Universidad Católica de Chile en 1995. Actualmente es el Vice Gran Canciller de esta casa de estudios. Profesor en el Seminario Pontificio de Santiago desde 1985 y en la Facultad de Teología desde 1993. Fue vice-decano de la Facultad de Teología.

el proyecto

genoma HUMANO

POR MANUEL SANTOS



Científicamente, el siglo XX sorprendió a la sociedad con dos grandes logros que involucran viajes: uno hacia el exterior: el alunizaje de astronautas en 1964, y uno hacia el interior del hombre mismo: la obtención del primer borrador del genoma humano, en el 2000. Este conocimiento sobre el genoma humano maravilla y a la vez, inquieta por la eventual posibilidad de manipulación, y por sus eventuales implicancias sobre asuntos antes considerados propios de los designios de Dios y la naturaleza y, por ende, inmanejables y no manipulables.

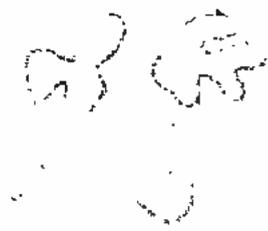
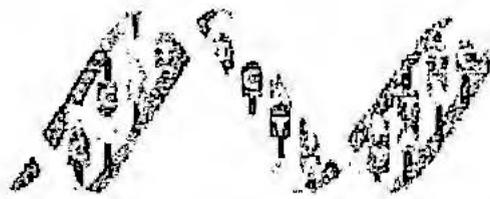
SÓLO UN 3% DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA REPRESENTARÍA A LOS GENES QUE SE EXPRESAN EN ALGÚN PRODUCTO. EN OTRAS PALABRAS, EL 97% DEL GENOMA NO TENDRÍA FUNCIÓN CONOCIDA. POR OTRA PARTE, LA COMPARACIÓN ENTRE EL GENOMA DE DOS PERSONAS DISTINTAS ARROJA UN 99.9% DE SIMILARIDAD GENÉTICA, LO QUE INVALIDARÍA EL CONCEPTO BIOLÓGICO DE RAZA.

GENES

y ambiente

Las características biológicas observables de un ser humano (fenotipo), tales como el color de los ojos, la forma del pelo, la estatura, el coeficiente intelectual, entre tantos otros, están determinadas por los genes, que se reciben de los padres, y el ambiente en el cual se desarrolla. El conjunto de genes de un individuo corresponde al genotipo. La totalidad de la información genética contenida en una célula humana es lo que se llama genoma humano.

Los seres humanos estamos formados por trillones de células (unidades básicas de todos los tejidos y órganos). Cada célula posee un citoplasma y un núcleo donde reside la información genética, distribuida en 46 cromosomas.



El desarrollo de los seres humanos comienza en el momento de la fecundación: cuando un espermatozoide (gameto masculino) fecunda a un óvulo (gameto femenino) originando una primera célula (cigoto), que a su vez, originará todas las células de los organismos adultos. El espermatozoide aporta 23 cromosomas, el óvulo los otros 23 cromosomas, y después de la fecundación el cigoto contiene todos los cromosomas (46).

Los cromosomas poseen muchos genes, que corresponden a las unidades de herencia. La información genética se encuentra codificada en pequeños trozos de la molécula de ADN. El ADN (ácido desoxirribonucleico) es una molécula simple y de aspecto semejante a una escalera doblada en forma de hélice. Los "largueros" de

la escalera están formados por moléculas de azúcar unidas a moléculas de fosfato y los "peldaños" están formados por moléculas denominadas bases nitrogenadas (o "letras"). Existen 4 bases nitrogenadas en el ADN: A (adenina); G (güanosina); T (timina) y C (citósina). Siempre A se une con T y G con C, por tanto existen sólo dos tipos de peldaños: A-T y G-C. El ADN es una molécula extraordinariamente simple y no obstante, toda la información genética reside en estas 4 letras, que se disponen en una ordenación particular (o "secuencia") en un trozo de ADN.

Los genes corresponden a segmentos de esta molécula de ADN, con una función particular y caracterizados por una secuencia u ordenación específica de estas 4 letras (bases nitrogenadas). Gene-

ralmente, un gen corresponde a una secuencia que determina una función específica, como por ejemplo, la formación de una proteína que cumpla un rol específico en las complejas vías metabólicas que presentan las diferentes células de nuestro organismo o una proteína que forme alguna estructura celular.

EL PROYECTO DEL GENOMA HUMANO (PGH)

Cada cromosoma está formado por una molécula de ADN y contienen cientos a miles de genes. En los 22 pares de cromosomas autosómicos humanos y en el par sexual X e Y, existen aproximadamente 30.000 genes. También existe material genético fuera de los cromosomas, en

unas pequeñas estructuras presentes en el citoplasma, denominadas mitocondrias, donde ocurre la producción de energía para la célula. El pequeño ADN mitocondrial ya conocido, contiene 37 genes y se transmite exclusivamente a través del óvulo materno.

El llamado «Proyecto del Genoma Humano (PGH)» (<http://www.ornl.gov/hgmis/home.html>) es un proyecto de investigación billonario cuyos objetivos son: 1) conocer la secuencia de todo el ADN humano (que contiene alrededor de 1 billón de bases nitrogenadas (letras), 2) identificar los ~30.000 genes y 3) conocer genes involucrados en enfermedades de causa genética y ambiental. Entre estos destacan los genes relacionados con Cáncer, por ejemplo, Cáncer de mama. En Junio del 2000, en un evento inédito se aunaron los logros científicos obtenidos por el PGH público con aquellos alcanzados por la empresa privada (Celera Genomics) y se dió a conocer a toda la sociedad, un primer borrador de más del 90% de la secuencia del genoma. Más recientemente, en Febrero del 2001, ambas instituciones entregaron la información completa del genoma, estimando que existen sólo ~ 30.000 genes humanos. Ello ha impactado en múltiples áreas de la sociedad. Con todo el revuelo que ha provocado el PGH, existe el peligro de considerar que todas las características biológicas

de un ser humano radican en sus genes (reduccionismo genético). Sin embargo, conviene señalar que los genes no actúan por separado sino que necesitan interactuar entre sí y con el ambiente para desarrollar su potencialidad. No existe una relación lineal entre un determinado gen y el fenotipo, sino que por el contrario, existen una serie de relaciones complejas entre un determinado gen y otros genes y el ambiente para producir un fenotipo.

IMPACTO CIENTÍFICO DEL PGH en biología Y MEDICINA

Científicamente, tres aspectos biológicos relacionados al conocimiento del primer borrador del genoma humano han resultado muy novedosos. Por una parte, se estima que existen ~ 30.000 genes, una cifra reducida y no tan diferente de los genes de un ratón. Ello posee un hondo significado en términos evolutivos relacionados con el origen del hombre. Como no se conoce la función de todos estos genes, se ha iniciado otra tarea gigantesca que es conocer los productos (las proteínas) de ellos (Proteómica). Además, se encontró que alrededor del 97% del genoma no correspondería a genes, es decir sólo un 3% de la información genética representaría a los genes que se expresan en algún producto. En otras palabras, el 97% del

genoma no tendría alguna función conocida. Por otra parte, la comparación entre el genoma de dos personas distintas arroja un 99.9% de similaridad genética, lo que invalidaría el concepto biológico de raza.

A nivel de la medicina, el impacto ya producido y el que se está progresivamente generando, se refiere a una nueva concepción de una Medicina más preventiva, en contraste a la actual Medicina curativa. El conocimiento de la constitución genética de una persona podrá ayudar a prevenir el desarrollo de enfermedades futuras, no sólo de afecciones genéticas sino que incluso de afecciones de causa ambiental, como por ejemplo, el conocimiento de genes de susceptibilidad para enfermedades infecciosas). En un futuro no muy lejano el actual perfil bioquímico será muy probablemente reemplazado por un "perfil genético". El conocimiento obtenido por el PGH ha permitido el desarrollo de sofisticados tests de diagnóstico genético (incluso utilizando microchips de ADN, que en la actualidad, ya pueden diagnosticar hasta 10.000 mutaciones). Estos tests pueden aplicarse a personas ya enfermas o a aquellas que todavía no han desarrollado una particular afección genética (diagnóstico presintomático). También pueden aplicarse para el estudio de células del feto durante su desarrollo

en el vientre materno, mediante diagnóstico genético prenatal (a través de Amniocentesis, Biopsia de vellosidades coriales, sangre materna, etc.), con el consiguiente ofrecimiento de aborto (mal llamado "terapéutico") a las madres que gestan fetos afectados por enfermedades genéticas y que corresponde definitivamente a un aborto eugenésico. Actualmente, estos tests diagnósticos genéticos se pueden aplicar a nivel de células embrionarias antes de la implantación de los embriones obtenidos mediante Fertilización *in vitro* (diagnóstico genético preimplantacional). Ello no sólo permite determinar el sexo del embrión, sino que pesquisar enfermedades genéticas y realizar así implantación de sólo aquellos embriones sanos («selección embrionaria»). Por otro lado, el conocimiento del PGH está permitiendo el desarrollo de Terapias Génicas, para intentar curar definitivamente algunas afecciones genéticas. En terapia génica se usa la tecnología del ADN recombinante para corregir un gen defectuoso, y ojalá reemplazarlo por el gen normal, en forma permanente. Esta Terapia Génica puede ser de tipo somática, que tiene validez sólo para el individuo que la recibe y para la que existe gran consenso en su utilidad y de tipo germinal; que no sólo modificaría la información genética del individuo que la recibe, sino

que él transmitirá esa modificación a sus descendientes, con insospechadas consecuencias, por lo que ella tiene grandes reservas éticas y es censurada por la inmensa mayoría de científicos. En la actualidad, ya se están llevando a cabo varios intentos clínicamente controlados de terapia génica humana. Finalmente, el PGH contribuirá al desarrollo de nuevas drogas, que permitan un tratamiento más individualizado para cada paciente, de acuerdo a su constitución genética.

ASPECTOS ÉTICOS, LEGALES Y SOCIALES (e)lsi) del PGH

El Proyecto del Genoma Humano tiene un profundo impacto a nivel ético, legal y social (ELSI), por lo que un monto significativo de sus fondos está dedicado a analizar estas implicancias. Entre ellas, conviene señalar: la identificación genética (estudios de paternidad, identificación criminalística), el acceso a la información de las características genéticas de las personas por parte de las aseguradoras de salud y empleadores, las consecuencias del conocimiento del estado de portador de una enfermedad genética que se desarrollará en el futuro, el debate de ideas eugenésicas y racistas, etc. Un ejemplo emblemático corresponde al gen que da susceptibilidad a Cáncer de mama en algunas mu-



jerces: si una mujer se realiza el test para este gen, tienen derecho las Isapres y los empleadores a conocer esta información antes de asegurar o emplear?.

Si bien los grandes avances científicos en el ámbito de la genética han invadido el terreno de la intimidad de los seres humanos, obligando a la sociedad a plantearse preguntas básicas acerca de nuestra naturaleza, no es menos cierto que estos avances han contribuido a confirmar la individualidad de los seres humanos, materia de discusión permanente en el ámbito filosófico y religioso. Es de esperar que el hombre aplique sabiamente estos grandes conocimientos que ha logrado obtener recientemente, para intentar mejorar la calidad de vida de los seres humanos, particularmente de aquellos más discapacitados.

MANUEL SANTOS, profesor adjunto en los Departamentos de Pediatría y de Biología Celular y Molecular, en la Facultad de Ciencias Biológicas y Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Doctor en Ciencias Biológicas con mención en Biología Celular y Molecular, ha cursado especializaciones en Genética Médica en The John Hopkins University, Baltimore, y en citogenética con el prof. Jerome Lejeune en la Universidad de París.

el derecho tras el genoma

POR JAVIER RAMÍREZ

La Constitución asegura a todas las personas:
El derecho a la vida y a la integridad física y psíquica de la persona.
La ley protege la vida del que está por nacer.²

Un eterno "ir atrás". Así podríamos catalogar el sino de la historia del derecho desde sus comienzos. Un eterno "ir atrás" respecto de las materias que intenta regular y los nuevos problemas que surgen en la sociedad cuya convivencia está llamado a normar. Fue así desde que el hombre descubrió el fuego, cuando debió adaptar normas creadas para un mundo en el que la noche era invencible y donde su vida dependía totalmente de la luz solar. Las normas que regían entonces no contaban con la realidad de la llama y sus infinitas posibilidades. Los creadores de aquellas normas no tenían cómo prever un descubrimiento de tal envergadura, así como nuestros legisla-

dores no podían saber que el avance de la ciencia crearía las posibilidades y dilemas que hoy genera el Proyecto Genoma Humano.

Este "ir atrás" del derecho consiste en su imposibilidad esencial de cubrir todas las situaciones o casos en que la norma será aplicada en el futuro. Si lo intentara, o su casuística la haría inaplicable a corto plazo, o su amplitud la volvería ineficaz. Se refleja también en su naturaleza conservadora, que a través de la norma fija parámetros de conducta, por lo que al intentar regular nuevas situaciones debe modificar por lo general todo un esquema, no bastan-

do con crear o cambiar una norma particular, lo que vuelve el sistema más engorroso y de difícil aceptación. Una situación que más que nunca vemos reflejada a la luz de los nuevos descubrimientos y tecnologías surgidos con el desciframiento del genoma humano.

Analicemos por partes Proyecto Genoma Humano, tecnología del DNA recombinante, terapias génicas, son parte de los nuevos elementos que modifican la conducta de nuestra sociedad y que crean un escenario ante el cual el derecho debe reaccionar adecuadamente. ¿Las soluciones? Mucho dependerá de una categorización de los problemas causados.



- **Nuevas y refinadas formas de discriminación.** Con el mapeo y secuenciación del Genoma Humano es posible tener conocimiento de ciertas características de una persona, antes imposibles de determinar, dando espacio a su diferenciación y por tanto a su posible discriminación de maneras nunca vistas. Nuestra Constitución, como asimismo la mayoría de las constituciones del mundo, prohíbe la discriminación enfatizando la igualdad entre todas las personas, entregando las herramientas necesarias para corregir la infracción a la norma (recurso de protección en nuestro derecho). Sin embargo lo que se prohíbe es la discriminación arbitraria, es decir aquella hecha irracionalmente o por puro capricho (por ejemplo el racismo) y no el trato diferente que se le da a personas diferentes. Pues bien, éste será sin lugar a dudas un punto de fricción entre aquellos grupos interesados en que las diferencias genéticas (tal vez la tendencia a desarrollar cierta enfermedad) sean consideradas discriminaciones arbitrarias y aquellos que no lo consideran así. Esto se verá especialmente en las aseguradoras y en las Isapres, a quienes convendrá pedir una prima o cotización mayor, o incluso negar el servicio, a aquellos clientes que saben serán más costosos para ellos en el futuro.

- **Privacidad.** Muy ligado a lo anterior se encuentra el área de protección a la vida privada de las personas. Esto se da específicamente en la forma de tratar los datos genéticos obtenidos de una persona que voluntariamente (o no) se someta a alguna forma de testeo genético. Una persona que sabe que desarrollará una enfermedad, ¿debe comunicárselo a su empleador o asegurador? ¿Tienen éstos derecho a saberlo? Si la eventual enfermedad fuera transmisible hereditariamente, ¿tiene la persona "derecho a reproducirse"? ¿Tiene el Estado el poder de prohibírselo? Muy probablemente se desarrollarán bases de datos genéticos a similitud de lo que sucede con los antecedentes comerciales en la actualidad. ¿Podrán dichos datos transarse libremente en el mercado?
- **Patentes.** El conocimiento obtenido a partir del mapeo de los genes humanos dará como resultado nuevas formas de diagnóstico de enfermedades, como asimismo nuevos medicamentos y tratamientos. Todo ello tiene un valor comercial innegable. ¿Será lícito permitir el patentamiento de los genes humanos que hacen posible dichos fármacos y tratamientos? De no ser así, ¿cómo se logra el estímulo para la legítima recompensa del investigador que se dedica a estos descubrimientos?
- **Nuevos tipos penales.** Los intentos de regular estos nuevos descubrimientos y sus múltiples posibilidades están dando lugar a nuevos

tipos penales, que crean y protegen nuevos bienes jurídicos (por ejemplo, "la identidad genética"). Por otra parte, con las nuevas técnicas se da una poderosa herramienta a la ciencia forense y se aportan elementos probatorios al proceso penal con una certidumbre inédita (también en materias no penales, como los juicios de paternidad). ¿Se lo debe incorporar como elemento probatorio independiente o incluirse dentro de los actuales, como la prueba de peritos? Teniendo en cuenta el grado de certidumbre que otorga, ¿qué valor probatorio debe otorgársele?

Estos y otros son los problemas que el derecho deberá abordar. Para ello tendrá que variar su manera tradicional de enfrentar los problemas, sin tratar de hallar todas las respuestas únicamente dentro de los límites de su disciplina, intentando adoptar una conducta más propia del científico que del jurista: comenzar a hacerse preguntas antes de dar la respuesta.

JAVIER RABATEZ R. Licenciado en Derecho de la Pontificia Universidad Católica. Su tesis de grado versó sobre "La propiedad de los recursos genéticos, la patentabilidad de genes humanos". Asesoró al Senado de la República en la redacción de la ley que prohíbe la clonación humana, próxima a promulgarse.

¿Cuáles son las causas del cáncer?

Los dos agentes principales, a saber, el tabaco y la dieta, dan cuenta de casi dos terceras partes de las muertes atribuidas a esa patología

Dimitrios Trichopoulos, Frederick P. Li y David J. Hunter

El cáncer, uno de las causas más frecuentes de muerte a lo largo de la historia, apretó su garra con el progreso industrial y técnico del hombre. Aunque el riesgo de algunos tipos de neoplasias ha declinado de forma espectacular en los países desarrollados durante este siglo, la incidencia de las formas más significativas no ha dejado de crecer. Los cánceres de pulmón, mama, próstata, colon y recto se han hecho más frecuentes allí donde han aumentado los factores de riesgo: tabaco, hábitos alimentarios inadecuados y exposición a agentes químicos peligrosos en el puesto de trabajo o en el ambiente.

Conforme se extiende la industrialización, se amplían también las causas sospechosas de inducir cáncer. En los últimos años han venido sonando alarmas que implicaban a todo tipo de productos modernos, desde fármacos hasta teléfonos móviles. El ritmo de los avances técnicos hace ahora más crítica que nunca la necesidad de acotar las causas reales del cáncer entre un conjunto creciente de posibilidades.

Para abordar esta tarea gigantesca, hemos de apoyarnos en la epidemiología. Compete a ésta descubrir los

factores que se repiten en la historia clínica de las víctimas de cáncer y en su estilo de vida, para interpretar su significado en el marco de la doctrina biológica. En última instancia, los indicios extraídos podrán convencer a los investigadores de cuál o cuáles sean los factores o circunstancias "causantes" de la enfermedad; o dicho de otra manera, que la exposición ante ellos aumenta de forma significativa el riesgo de la enfermedad.

A lo largo de los últimos cincuenta años, la epidemiología ha permitido no sólo determinar las causas ambientales (no vinculadas a la herencia), sino también calcular el número de muertes que cada año pueden atribuirse a cada una de ellas. Aunque estos trabajos no sirven para prever qué le sucederá a un individuo en particular, proporcionan, sin embargo, una valiosa información a quienes se preocupan por reducir al mínimo la exposición a agentes carcinogénicos.

Agentes carcinogénicos

Podemos reducir a dos principales los tipos de agentes carcinogénicos. Comprende el primero los agentes que actúan contra genes implicados en el control de la proliferación y migración celulares. El cáncer se produce cuando se acumulan en una célula varias mutaciones. En un proceso que suele tardar bastantes años, y ella logra por fin zafarse de los frenos que regulan la proliferación. Las mutaciones facilitan que la célula original y su progenie sufran ulteriores alteraciones, amén de multiplicarse en número creciente hasta constituir un tumor, integrado fundamentalmente por células anormales. El segundo tipo refiere a los agentes que no dañan los genes, sino que potencian selectivamente el creci-

miento de células tumorales o de sus precursoras. El peligro primario de un cáncer radica en la posibilidad de metástasis, esto es, en que las células emigren y lleven la enfermedad a otras regiones del organismo. Por último, la enfermedad puede alcanzar y destruir un órgano vital.

Nadie discute que la exposición reiterada de zonas del organismo a sus componentes químicos del humo del tabaco, por ejemplo, no termine por inducir alteraciones celulares que degeneren en cáncer. Pero desconocemos los mecanismos en virtud de los cuales tal exposición origina las alteraciones aludidas. Para una teoría bastante asentada desde hace tiempo, muchos agentes deletéreos del ambiente, así como el envejecimiento y otros procesos vitales, ejercen su función nociva a través de la formación creciente de radicales libres en el organismo; estos fragmentos moleculares son muy reactivos. Al interactuar con el ADN de un gen, los radicales libres pueden lesionar y mutar un gen de modo permanente. Otros carcinógenos, por ejemplo, son determinados virus, operarían de forma distinta: acelerando el ritmo de división celular.

Ni que decir tiene que los genes que heredamos de nuestros progenitores influyen también en la aparición del cáncer. Algunas personas nacen con mutaciones que promueven directamente el desarrollo excesivo de ciertas células o la formación de mutaciones adicionales. La presión evolutiva, sin embargo, asegura que tales mutaciones no abunden; son responsables de menos del 5 por ciento de todas las neoplasias letales.

Aparte de las mutaciones sufridas en los genes que regulan el crecimiento celular, los rasgos fisiológicos heredados de carácter general intervienen, en cierta medida, en la mayoría de los tumores que aparecen en el hombre. Por ejemplo, el hecho de heredar una piel muy blanca favorece el cáncer de piel. Ahora bien, aunque las personas de piel muy blanca sean más propensas, desarrollan la enfermedad sólo después de la exposición prolongada a la radiación solar, un carcinógeno ambiental. Además, si alguien hereda una variante genética que hace que el organismo no elimine eficazmente determinados carcinógenos, esa persona, después de una exposición repetida a estos agentes, se hallará más propensa al cáncer que otro sujeto que posea una forma más eficiente del mismo gen.

DIMITRIOS TRICHOPOULOS, FREDERICK P. LI y DAVID J. HUNTER pertenecen a la Universidad de Harvard. Trichopoulos, que nació en Atenas, enseña epidemiología. Li, de origen chino, da clases también en la facultad de medicina. Hunter procede de Australia; en Harvard dirige el Centro para la Prevención del Cáncer, institución que ha prestado toda su ayuda a los autores en la preparación de este artículo.

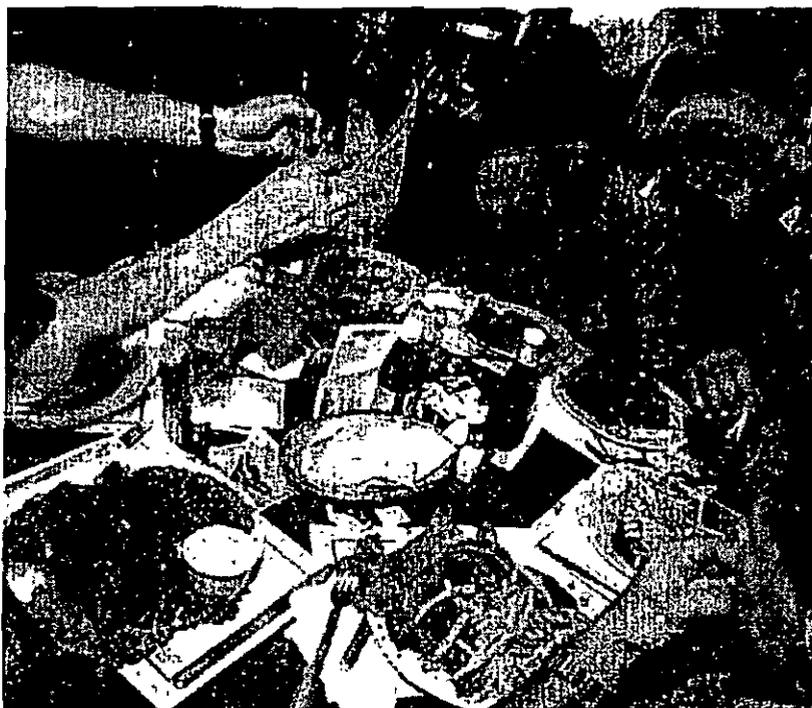
A propósito del cáncer suele preguntarse cuántos casos se producirían de manera espontánea en individuos sanos, genéticamente normales, que hayan conseguido evitar la exposición a los carcinógenos del entorno. Sobre esa cuestión disponemos de cálculos sólo aproximativos, resultantes de la comparación entre poblaciones con pautas tumorales muy dispares. Quizás una cuarta parte de todos los cánceres pertenezcan al "núcleo duro", es decir, que se manifestarían incluso en un mundo libre de influencias externas, causados por carcinógenos del propio organismo y la acumulación de errores genéticos sin restañar.

Los epidemiólogos han mostrado, sin embargo, que, en la mayoría de los casos, el ambiente (en el que se incluye el estilo de vida) desempeña un papel determinante. ¿Son fiables estos datos? El punto débil de la epidemiología del cáncer radica en la imposibilidad de realizar pruebas en las que grupos de personas, elegidas al azar, se expusieran a carcinógenos potenciales o ni siquiera a compuestos que evitaran en potencia la aparición de neoplasias. La ética rechaza los ensayos aleatorios con agentes oncogénicos; por desgracia, la carencia de este tipo de estudios puede complicar gravemente la interpretación de los datos.

Limitaciones de la epidemiología

En consecuencia, los estudios epidemiológicos sólo descubren la causa de la enfermedad cuando se sabe que la gente que padece determinado cáncer ha sufrido una exposición intensa y manifiesta a un agente concreto. En opción alternativa, puede defenderse la existencia de una vinculación al menos débil, reiterada entre un tipo de cáncer y cierto agente: una relación observada en múltiples circunstancias y respaldada por una congruencia biológica.

De acuerdo con lo que acabamos de exponer, hemos basado nuestra crítica de las pruebas de carcinógenos en un doble criterio: la sobreabundancia de datos epidemiológicos cuando mecanismos biológicos se muestran, sin embargo, en el terreno de la especulación; y descubrimientos epidemiológicos que, aunque impredecibles, son coherentes y fiables para la biología. El papel de las hortalizas y la fruta en la prevención del cáncer, por ejemplo, tiende a situarse



ALIMENTOS GRASOS como éstos que aparecen sobre la mesa de un restaurante de Nueva York facilitan la formación de tumores muy diversos.

en la primera de esas categorías, mientras que el potencial carcinogénico del humo del tabaco en los fumadores pasivos encaja en la segunda; así, es bastante restringido el número de personas afectadas por cáncer de pulmón si sólo se considera el hecho de haber estado expuestas al humo del tabaco como fumadores pasivos, aunque la relación goza de respaldo documental y teórico suficiente.

Los datos que aquí presentamos constituyen un exudado de centenares de estudios; las opiniones que aducimos son, asimismo, compartidas por muchos investigadores y profesionales de la salud, cuando no por la mayoría. A tenor de las reglas de los estudios epidemiológicos sobre el cáncer, nuestra atención se centrará en los casos letales; no en todos los episodios neoplásicos, para evitar las distorsiones que introducen los cánceres comunes que raramente presentan un pronóstico fatal. Los resultados que presentamos conciernen al mundo desarrollado, mientras no se indique lo contrario. Los datos de las naciones industrializadas no son aplicables necesariamente a los países en vías de desarrollo, donde predominan los cánceres de origen infeccioso y, cada vez más, los causados por carcinógenos laborales.

El tabaco, principal factor carcinógeno

Más de la mitad de los fallecimientos que provoca el cáncer en los Estados Unidos—tal vez hasta el 60 por ciento— puede atribuirse al tabaquismo y la dieta. Desglosado el guarismo, el tabaco causa el 30 por ciento de las muertes, lo que lo convierte en el factor carcinógeno más letal de Norteamérica. Dejando aparte tabaco y dieta, los demás agentes ambientales responden sólo de un escaso porcentaje de la mortalidad.

El hábito de fumar, en particular cigarrillos, provoca cáncer de pulmón, tracto respiratorio superior, esófago, vejiga y páncreas y, probablemente, de estómago, hígado y riñón. El tabaco está implicado en la leucemia mielo-cítica crónica y puede desencadenar cáncer de colon y recto y de otros órganos. Que el tabaco dé o no lugar a una neoplasia depende del número de cigarrillos, el contenido en alquitrán y, sobre todo, de la persistencia en el hábito, entre otras circunstancias. Si se ha adquirido el hábito de fumar en la juventud, el peligro se multiplica. Los riesgos varían de uno a otro tipo de cáncer; una muestra: en los fumadores la probabilidad de

sufrir cáncer de vejiga se duplica y la de cáncer de pulmón se octuplica.

En los fumadores pasivos el tabaco causa menos cánceres de pulmón que en los activos. Lo que no impide que cada año mueran por ese motivo, sólo en los Estados Unidos, varios miles de personas. El humo de los fumadores resulta para quienes están cerca de ellos tan poligénico como el aire contaminado del exterior o la exposición al radón, gas radiactivo que emana naturalmente del suelo en determinadas zonas de la tierra.

Come bien para vivir más

En los países avanzados, sólo la dieta rivaliza con el tabaco en potencia oncogénica y letalidad. La grasa animal (saturada) en general y la carne roja en particular se asocian con varios tipos de cáncer; ambas están relacionadas con tumores de colon y recto; las grasas saturadas podrían hallarse también implicadas en el cáncer de próstata.

Pero los investigadores siguen desconcertados ante aspectos sorprendentes de las grasas de la dieta. Los estudios realizados con animales revelan que, en determinadas condiciones, ciertos tipos de grasas poliinsaturadas aumentan el riesgo de cáncer en unas zonas del organismo, aunque se carece de datos que corroboren ese fenómeno en humanos. Por otra parte, la investigación rigurosa respalda viejas hipótesis sobre la vinculación de las grasas de la ingesta con neoplasias. Por ejemplo, trabajos de seguimiento que abarcan un período de doce años muestran que no hay fundamento para afirmar que una dieta rica en grasa (especialmente, en grasa animal) aumenta el riesgo de cáncer de mama entre las mujeres.

Entre los aditivos no nutritivos de los alimentos, sólo la sal parece contribuir de manera significativa al desarrollo del cáncer. Una ingestión elevada de la misma podría conducir a la aparición de un cáncer de estómago. En el sureste asiático, los niños que comen abundante pescado salado se muestran más predisuestos al cáncer nasofaríngeo (la parte superior de la faringe, que llega hasta las fosas nasales). De manera semejante, la ingestión de hoidas muy calientes, incluido el mate, se ha asociado con un incremento del riesgo de cáncer de esófago.

Por contra, la mayoría de las investigaciones sobre el café (con o sin cafeína) no apuntan a una relación de éste con el cáncer en el

Microbios causantes de cáncer

Hace ya más de un siglo que los expertos sospecharon la posibilidad de que los tumores estuvieran causados por virus y otros agentes infecciosos. Por los años se sucedían y fracasaban cuantos intentos se acometían por ver la hipótesis. La introducción de diversas infecciones en animales no produjo cáncer. Poco a poco, la idea fue perdiendo aceptación.

Las cosas cambiaron en los últimos 20 años. No sólo se ha demostrado que muchos tipos diferentes de cáncer se deben a virus, bacterias o parásitos, que se ha descubierto también que ha de atribuirse hasta un 16 por ciento de las muertes de origen canceroso. La inmensa mayoría de estos casos ocurren en países en vías de desarrollo, donde predominan las enfermedades infecciosas. Aunque no se escapan tampoco los países avanzados; un 5 por ciento de las muertes por cáncer que se registra en los Estados Unidos resulta de enfermedades producidas por infecciones. La determinación exacta de proporciones es difícil; a menudo, para que una infección evolucione en cáncer, han de transcurrir varios decenios.

Los patógenos habituales de formas cancerosas son los virus de ADN que propagan invadiendo las células del hospedador y usando la maquinaria de éstas para la síntesis de ADN y de proteínas y así generar copias de sí mismos. Entre estos agentes carcinogénicos, los dos principales son los papilomavirus humanos de los tipos 16 y 18, que se transmiten por vía sexual, y el virus de la hepatitis B. Los papilomavirus provocan, entre otros, cáncer de cuello de útero y el virus de la hepatitis B, cáncer de hígado.

Aunque los papilomavirus de los tipos 16 y 18 son responsables del 70-80 por ciento de los casos de cáncer de genitales y de ano, otros 30 tipos de papilomavirus pueden estar implicados en estas patologías, que afectan a las mujeres con frecuencia mayor que a los varones. En ciertos lugares —de manera notable en el Japón— el virus de la hepatitis C causa casi tantos cánceres de hígado como el de la hepatitis B. La verdad es que las infecciones víricas, las hepáticas

varón. Ni siquiera parece importar el edulcorante que se utilice; cantamos con datos fehacientes para mantener que los edulcorantes artificiales, ingeridos en cantidades razonables, no causan cáncer.

Los nexos entre dieta y cáncer, sin embargo, no se cifran a lo que se come; se reflejan también en lo que falta en la mesa. Por razones que no acabamos de comprender, las dietas pobres en frutas y verduras favorecen la manifestación de diversos tumores. La eficacia preventiva de estos alimentos puede provenir de constituyentes específicos que bloqueen las actividades carcinogénicas de sustancias generadas en nuestro organismo. A este propósito, se supone que los antioxidantes presentes en los alimentos neutralizan los radicales libres. Otros compuestos químicos de los alimentos, según se ha sugerido, bloquean las señales que envían los estrógenos: señales que envían estos

esteroides inducen la proliferación de las células mamarías. Pero los alimentos contienen millares de compuestos, y los investigadores continúan sin poder decidir cuáles, y en qué combinaciones, resultan más eficaces para inhibir el cáncer.

La dieta influye no sólo con el tipo de calorías consumidas, sino también con la cantidad. Se admite que la ingestión de energía en mayor cantidad que la gastada resulta perjudicial para la vida, si bien los mecanismos interesados varían probablemente según la edad. Los niños que comen en exceso y hacen poco ejercicio suelen crecer más y más tarde más propensos a ciertos tipos de cáncer.

La investigación ha obtenido unos resultados sorprendentes a propósito del cáncer de mama. Un desarrollo desproporcionado en la infancia, reflejado en la mayor estatura y peso adelante, así parece, la menarquia, este avance de la menstruación constituye un factor de riesgo importante de cáncer de mama, y no sólo de esa neoplasia. En cifras, la sobrealimentación y la falta de ejercicio a edades tempranas intervienen en un 5 por ciento de los cánceres de mama y de próstata, dos especies que son letales con bastante frecuencia.



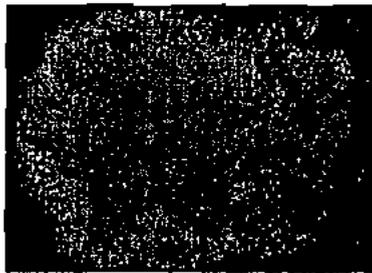
todo, según detrás de un 80% de los casos de cáncer de hígado en todo el mundo.

Otros virus causan tipos de cáncer distintos, algunos bastante raros. Así, el virus de Epstein-Barr, famoso por producir mononucleosis, evidencia a veces una capacidad carcinogénica. Se le atribuyen nada menos que la mitad aproximada de cánceres de la faringe superior, más del 30 por ciento de todos los casos de enfermedad de Hodgkin, el 10 por ciento de los de linfoma no Hodgkiniano

y algunos tumores gástricos. El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) puede causar el sarcoma de Kaposi, forma cancerosa de los tejidos blandos, y el linfoma, un tipo de cáncer caracterizado por una proliferación anormal del tejido linfático.

Helicobacter pylori es la única bacteria asociada al cáncer. Insta en parte su formación provocando úlceras gástricas. *H. pylori* acostumbra coincidir con el cáncer de estómago, aunque la proporción de casos atribuibles a la bacteria está aún por determinar.

La investigación se apresta ahora a descubrir por qué esos patógenos generan el cáncer en algunas personas infectadas y no en otras. En ese contexto, se acaba de señalar la presencia de tumores secundarios que pueden entorpecer la acción del sistema inmunitario del hospedador antes de que una infección se tome cancerosa. Un conocimiento más exacto de la cadena de procesos que tienen lugar facilitaría la adopción de medidas preventivas (vacunas) que bloquearan los procesos secundarios, evitando así que la enfermedad degenera en cáncer.



PAPILOMAVIRUS, un agente importante de cáncer.

—D.T., F.P.L. y D.J.H.

En la obesidad de la mujer adulta se esconde una causa importante del cáncer de endometrio (el revestimiento del útero) y, también, un motivo reiterado, aunque sutil, del cáncer de mama posmenopáusico. Por razones desconocidas, la obesidad fomenta el riesgo de cáncer de colon, riñón y vesícula biliar.

El consumo elevado de alcohol, sobre todo por fumadores empedernidos, potencia el peligro de cáncer del tracto respiratorio superior y del aparato digestivo; la cirrosis alcohólica puede degenerar en cáncer de hígado. Aunque la ingestión moderada de alcohol reduce el riesgo de enfermedades cardíacas, bastan, eso apuntan los datos, una o dos consumiciones diarias para propiciar el desarrollo de un cáncer de mama y quizá los tumores de colon y recto. En número, las bebidas alcohólicas contribuyen en un 3 por ciento a la mortalidad por cáncer en el mundo desarrollado. (Este porcentaje equivale a un 30 por ciento más del asignado a la dieta.) Los hábitos sedentarios dan cuenta de un 3 por ciento adicional, y otro uno por ciento los aditivos de los alimentos, fundamentalmente la sal.

La diferencia del tabaco y de los hábitos alimentarios, otras amenazas, más o menos clamorosas, sean dif-

ciles de evitar. Aludimos a las radiaciones producidas por el sol, líneas eléctricas, electrodomésticos, teléfonos portátiles y gas radón. Se le atribuye el 2 por ciento de todas las muertes por cáncer. En su mayoría, el fallecimiento se debe a alguna fuente natural de radiación y acostumbra resultar de un melanoma, cáncer de la piel provocado por los rayos ultravioleta del sol.

¿Qué decir de las radiaciones?

Dentro del espectro ultravioleta que alcanza la superficie de nuestro planeta, el componente que encierra mayor peligrosidad son los rayos B ultravioleta de alta frecuencia, que dañan la cadena de ADN. Tales radiaciones B son las culpables de más del 90 por ciento de los cánceres de piel, melanomas incluidos, cuya letalidad supera la del resto de neoplasias dérmicas. Muchos autores opinan que el factor clave en la producción del melanoma no reside tanto en la exposición continuada a la radiación solar cuanto en la frecuencia de quemaduras solares en la infancia.

Otra fuente natural de radiación es el radón. Este gas incoloro e inodoro emerge de la tierra en determinadas regiones. Puede introducirse en los

edificios y acumularse en la planta baja y en los sótanos. Se ha vinculado una mayor incidencia del cáncer de pulmón con la respiración prolongada de radón en concentraciones elevadas, principalmente en el interior de minas. Pero no puede decirse que esa forma de radiación sea una causa importante de cáncer en general; además, los niveles de radón bajan con la ventilación de edificios y minas.

Se sabe que los campos eléctricos y magnéticos generados por el tendido eléctrico y los aparatos electrodomésticos, que oscilan a 50 ciclos por segundo, son campos de extrema baja frecuencia. Han despertado notable interés por si guardaban alguna relación causal con el cáncer. Hasta la fecha, los datos de conjunto son confusos, se han difundido de forma exagerada y no se han entendido bien por el público. No es raro que siembren el miedo, al prescindir del soporte científico. Que se sepa, por radiación no puede inducirse una mutación genética a menos que las moléculas del organismo se ionicen, es decir, adquieran una carga mediante la ganancia o pérdida de uno o más electrones. Pero: los fotones asociados con campos de frecuencias extremadamente bajas tendrían que poseer una energía un millón de veces superior para ionizar las moléculas.

Los estudios epidemiológicos indican, sin embargo, que estos campos sí podrían potenciar en cuantía marginal el riesgo de leucemia infantil; mucha menos consistentes son las observaciones concernientes a otros tipos de cáncer. No debe descartarse la posibilidad de que los tendidos eléctricos influyan en el desarrollo de algunas neoplasias, pero los datos no disipan las dudas. Incluso en la propia leucemia infantil, la información global recabada es tan débil, que lo mismo puede reflejar una vinculación real con la patología que traslucir una errónea compilación de datos epidemiológicos.

El miedo a los campos de frecuencia extremadamente baja obedece a diversas razones subyacentes; una primera es la asociación incorrecta entre estos campos y otras formas de radiación; una segunda tiene que ver con la amplia publicidad que se ha dado a estudios de corto alcance y provisionales.

La radiación electromagnética de radiofrecuencia, que emiten los teléfonos móviles, los aparatos de microondas y otros sistemas inalámbricos o incluso los seres vivos, difiere

Agentes carcinogénicos en el lugar de trabajo

Asbesto	Mesotelioma, pulmón	Infrecuente	Revestimiento de frenos, asbestos, obreros de aislamientos y derrivos
Benceno	Leucemia mieloide	Frecuente	Industria (empleados de destilerías y petroquímicas, pinturas, pulmentaciones obreros del caucho)
Escape de los motores diésel	Pulmón	Frecuente	Ferrovieros, empleados de garajes de autobuses; conductores de camionetas; mineros
Formaldehído	Nariz, nasofaringe	Raro	Fabricadores de hospitales y laboratorios; manufactura de productos de la madera; pape, modales, prendas de vestir y productos metálicos
Fibras artificiales	Pulmón	Infrecuente	Aislamiento de paredes y conducciones
Tintes para el caballo	Piel	Infrecuente	Fabricación y carbones (detergentes para los dientes)
Radiación ionizante	Médula ósea, otros	Frecuente	Materiales radiactivos; productos y procedimientos médicos
Aplicaciones	Piel	Frecuente	Mecanizaciones mecánicas
Plaguicidas no arsenicales	Pulmón	Frecuente	Pulverizadores; campesinos
Pinturas	Pulmón	Infrecuente	Pintores profesionales
Bifenilos policlorados	Hígado, piel	Infrecuente	Líquidos hidráulicos, lomo-transferentes y lubricantes; tintes; adhesivos; insecticidas
Radón (gas de las minas)	Pulmón	Infrecuente	Minas (aunque no en el subsuelo)
Hollín	Piel	Infrecuente	Desaholladores; albaniles; bomberos; calefactores

por entero de los campos de frecuencias extremadamente bajas. A radiofrecuencias mucho más altas, la energía de los fotones se halla todavía por debajo, en varios órdenes de magnitud, del nivel que se requiere para ionizar una molécula. En los asentamientos urbanos, donde los campos de radiofrecuencia son más intensos, los niveles de la energía ambiental representan menos de una centésima parte que los emitidos por una persona. Se están estudiando las emisiones de ondas de radio asociadas con la telefonía móvil para descubrir si existe o no alguna posible conexión con el cáncer cerebral; los

datos obtenidos hasta hoy no permiten afirmar ninguna vinculación.

Por contra, la emisión que generan los materiales radiactivos y las reacciones nucleares sí es lo suficientemente energética para ionizar moléculas. No se discute tampoco su carcinogenicidad. Pero, de nuevo, el público tiende a sobrevalorar el riesgo de los niveles bajos de radiación. Entre los japoneses de Nagasaki y Hiroshima que sobrevivieron más de un año a las explosiones atómicas —y que estuvieron expuestos a unos niveles de radiación muchísimo más altos que los que la mayoría de la gente podrá jamás sufrir—, sólo un 1 por ciento

de ellos falleció de cáncer de origen radiactivo. La investigación epidemiológica no respalda la idea, muy extendida, según la cual se registró una mayor incidencia de leucemia entre quienes viven cerca de centrales nucleares y entre los hijos de quienes trabajan en reactores nucleares.

Trabajo, medicinas y microbios

Sustancias cuyo carácter carcinogénico conocemos ahora —amianto, benceno, formaldehído, gases de motores de combustión y radón— se consideraron en un comienzo peligrosas tras observar lo ocurrido en desgraciados "experimentos naturales"; nos referimos a las exposiciones a concentraciones elevadas en los lugares de trabajo. Gracias al control de estas sustancias carcinogénicas, al menos en el mundo desarrollado, la higiene y sanidad laboral parecen haber mejorado algo en los últimos años.

Medidas severas de control en los lugares de trabajo observadas a lo largo de los últimos 30 años han permitido rebajar la proporción de cánceres letales a menos de un 5 por ciento. Antes de 1950 la proporción sería el doble. Con todo, es muy posible que los cánceres relacionados con el trabajo, y que afectan sobre todo al pulmón, la piel, la vejiga y el sistema hematopoyético, aumenten en los países en vías de desarrollo conforme se van industrializando.

Al par que la exposición a diversas sustancias en el medio de trabajo, la terapia empleada nos ha llevado, sin buscarlo, a ahondar en los causas del cáncer, habida cuenta de que determinados fármacos y procedimientos han resultado ser carcinogénicos. Por paradójico que parezca, productos y procedimientos médicos podrían ser responsables de un 1 por ciento de todos los cánceres. Pero añadamos en pegada que su utilidad compensa con creces los riesgos. Lo que vale también para las terapias anticancerosas, incluidas la radiación y la quimioterapia. Algunos fármacos eficaces y combinaciones de ellos utilizados para el tratamiento de cánceres como la enfermedad de Hodgkin pueden dar lugar a una leucemia aguda en un 5 por ciento de los supervivientes y, en casos raros, a cáncer de vejiga.

Los fármacos inmunosupresores pueden ser también carcinogénicos, provocando ciertos linfomas. Con el cáncer de mama y de endometrio se ha relacionado la administración suple-

mentaria de estrógenos para contrarrestar los síntomas de la menopausia. Y los esteroides prescritos en el tratamiento de la anemia aplásica se han visto involucrados en casos raros de cáncer de hígado.

Los primeros informes que se elaboraron sobre tamoxifeno, un fármaco experimental utilizado en el tratamiento del cáncer de mama, indicaban que podría dar lugar ocasionalmente a cáncer de endometrio; estudios recientes se muestran menos tajantes. Las hormonas prescritas para favorecer la fecundidad que remedian los efectos de las gonadotropinas, Pergonal incluido, podrían aumentar el riesgo de cáncer de ovario. Las hormonas del crecimiento administradas a los niños podrían elevar el riesgo de leucemia. Algunos diuréticos podrían aumentar el riesgo de cáncer de riñón; determinados fármacos utilizados para bajar el nivel de colesterol, incrementar el riesgo de cáncer de colon y de recto, aunque tampoco en éstos los datos permiten sacar conclusiones firmes.

Los anticonceptivos orales elevan ligeramente el riesgo de ciertos tumores hepáticos y, en determinadas condiciones, del cáncer de mama premaligno. En el bando opuesto, las píldoras anticonceptivas reducen el riesgo de cáncer de ovario y endometrio y tal vez el de colon y recto.

Los virus y otros agentes infecciosos, que no se les incluía hace

apenas 30 años en la etiología de los tumores, pueden ser los culpables del 5 por ciento de todos los casos letales registrados en los países desarrollados.

Contaminación ambiental

En la producción de neoplasias humanas, la contaminación ambiental del aire, agua y suelos desempeña un papel infrecuente y difícil de documentar. Los efectos nocivos no suelen ser contrastables, porque generalmente son el resultado de una exposición a varios agentes carcinogénicos que se presentan en concentraciones muy bajas. Sin embargo, es razonable suponer que esas sustancias podrían dar cuenta de un 2 por ciento del global de cánceres letales, con particular incidencia en los de pulmón y vejiga.

La investigación ecológica, similar a la epidemiológica, aunque menos específica y pormenorizada, señala que la tasa de cáncer de pulmón en las ciudades contaminadas excede a la de las áreas rurales. Así, de los datos se infiere que los fumadores de las áreas urbanas son más propensos a padecer un cáncer de pulmón que los fumadores del medio rural, incluso después de tener en cuenta el comportamiento del fumador (número y tipo de cigarrillos, etc.). Sin



embargo, los no fumadores urbanos no parecen encontrarse en una situación de mayor riesgo de padecer cáncer de pulmón.

Tales estudios, unidos al seguimiento de las emisiones de gases y el análisis químico de muestras de aire de

las áreas urbanas, respaldan la tesis de que la exposición a niveles elevados de contaminación atmosférica podría elevar el riesgo de cáncer de pulmón en un 50 por ciento, sobre todo entre los fumadores. (Aunque esta cifra produzca la impresión de un gran salto, los fumadores empedernidos cuentan, de suyo, un riesgo incrementado en un 2000 por ciento.) Pocas dudas quedan sobre la capacidad carcinogénica del gas del escape de los motores diésel, probablemente más carcinogénico que el de otros motores.

Algunos investigadores sostienen que los compuestos orgánicos cuyas moléculas contengan cloro y anillos en su estructura aumentan el riesgo de cáncer de mama y, posiblemente, el de otras neoplasias relacionadas con los estrógenos hormonales femeninos. Entre estos compuestos se citan algunos producidos en la transformación de ciertos plaguicidas, como el DDT, en el interior del organismo. Apoyan su opinión en que esos re-

Concentración de cánceres en determinadas poblaciones

El mapa de West Islip, barrio de Long Island, aparece desplegado con sus tres metros de anchura sobre la mesa del comedor de Lorraine Pace, una vecina de 55 años que ha superado un cáncer de mama. Con ella son veinte las diagnosticadas dentro del perímetro de la comunidad. Unos días después de haberse le practicado una resección de un nódulo en 1992, Pace había galvanizado a las mujeres del lugar afectadas, y señaladas por cuadrados en el mapa en un esfuerzo para identificar los "focos" de la enfermedad. Esperaban poder establecer alguna correlación entre esos puntos y posibles riesgos ambientales; en definitiva, vincular la enfermedad a una causa.

A primera vista, tales concentraciones de cáncer en determinadas comunidades deberían ser el camino ideal para llevarnos hasta los agentes causantes del cáncer siguiendo la pista de los factores a los que estarían expuestos todos los individuos, el responsable no tardaría en dejarse ver. Sin embargo, la mayoría de las concentraciones parecen surgir al azar, razón por la cual las autoridades sanitarias no suelen dedicarle una atención singular.

En efecto, aunque varios agentes carcinogénicos se descubrieron tras el rastreo de esas concentraciones

(por ejemplo, la relación del consumo de vino con el angiosarcoma en los obreros de las fábricas de cloruro de polivinilo o la conexión del dietilstilbestrol con los cánceres ginecológicos en hijas de mujeres que tomaron este fármaco durante el embarazo), sólo en una de estas acumulaciones de casos ha sido posible llegar hasta la causa ambiental. En ese episodio, los investigadores relacionaron la extensión de un mesotelioma, un cáncer respiratorio raro, en una aldea turca con la erionita; este mineral semejante al amianto abunda en el suelo de la zona.

La reticencia de las autoridades sanitarias a dejarse arrastrar por las sospechas de una comunidad sobre la existencia de una causa determinante de un tumor generalizado en la población tiene que ver con la frecuente confusión de los reclamantes que tienden a colocar dentro de una misma categoría diferentes tipos de cánceres (que muy improbablemente se deban a un mismo agente carcinogénico). En su mayoría las concentraciones no son más que picos naturales dentro de la incidencia del cáncer.

De acuerdo con la teoría de la probabilidad, expone Raymond R. Neutra, del departamento de salud del estado de California, el 17 por ciento de las ciudades

noestrógenos remediarían la acción de los estrógenos del propio organismo (endógenos) y, por tanto, estimularían la división celular de la mama y de otros órganos de la reproducción. Pero hay pocos datos empíricos referentes a humanos, y téngase presente que la potencia estrógena de los xenoestrógenos es mucho más débil que la de los estrógenos endógenos.

De la vecindad de vertederos de sustancias peligrosas o de pozos contaminados podría resentirse la salud, aunque no se ha podido valorar el incremento del riesgo en relación con el cáncer. Se ignora si esa ausencia de asociación es real o si refleja, por contra, la incapacidad de los métodos estadísticos para aprehender una correlación muy débil.

Algunos trabajos han apuntado, aunque no demostrado, una tenue asociación positiva entre cloración del agua y cáncer de vejiga. En todo el mundo, y muy especialmente en los países desarrollados, se recurre a la cloración para destruir gérmenes en el agua potable. Aun cuando la cloración presentase algún riesgo ínfimo —que además no es seguro de que así sea— el peligro quedaría más que compensado por la capacidad del cloro para prevenir la dilución, a través del agua corriente, del cólera, la disentería y la fiebre tifoidea. Las investigaciones sobre la fluoración del agua han aportado tranquilidad.

Factores reproductivos y ginecológicos

Entre los procesos naturales del organismo, los relacionados con la reproducción son los más directamente vinculados, desde el punto de vista epidemiológico, con el cáncer. Para las mujeres, una menarquia precoz, la demora del primer embarazo y el retraso de la menopausia tienden a aumentar el riesgo de cáncer de mama; cuantos más hijos haya tenido una mujer, menor riesgo corre de cáncer de endometrio, ovario o mama.

No acabamos de encontrar una explicación fisiológica que vertebré todas esas observaciones. Nadie sabe exactamente por qué una menarquia precoz o una menopausia tardía se asocian con el cáncer de mama. En ambos casos se trata de un simple alargamiento del intervalo temporal en que la mujer está expuesta a sus propias hormonas sexuales, especialmente el estrógeno.

Los efectos protectores de una maternidad temprana podrían, por otra parte, reforzarse al promover una mayor diferenciación de las células mamarias. La diferenciación celular restringe las posibilidades de crecimiento anómalo, de cambio de tipo y de supervivencia en otros tejidos. Un primer embarazo a una edad joven podría instar la diferenciación de las células en una fase temprana de la vida,

haciéndolas menos sensibles a los carcinógenos.

En los países desarrollados la procreación está determinada fundamentalmente por factores sociales y económicos. Influye la educación. Por medio de los estudios y el ejercicio de la carrera, millones de mujeres de las naciones industrializadas retrasan los embarazos y tienen menos hijos, en general, que los que tuvieron sus madres y sus abuelas. Por desgracia, estas decisiones conducirán a una elevación de la incidencia de cáncer de ovario y de mama. El retraso del primer embarazo en mujeres jóvenes aumentará la tasa de cáncer de mama en un 5% en los próximos 25 años.

Algunos trabajos han vinculado el aborto provocado con cierto aumento del riesgo del cáncer de mama; no hay, sin embargo, resultados tajantes. Se ha apuntado también la asociación de neoplasias del tracto reproductor con determinadas conductas, pero tampoco los datos son concluyentes. Adquieran una importancia sólo marginal y se sospecha que las causas reales sean otras. Se adujo, por ejemplo, que la promiscuidad incrementa el cáncer de cuello de útero; pero ese riesgo parece provenir de una mayor exposición a virus humanos transmitidos por vía sexual.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, podríamos atribuir un 4% de las muertes por cáncer a factores relacionados con la reproducción.

de los Estados Unidos tendrían, en el intervalo de cualquier decenio, al menos 80 tipos reconocidos de cáncer con cifras elevadas, produciendo unas 4930 acumulaciones aleatorias. A tan elevada tasa de falsos positivos hay que agregar el problema de la legitimidad estadística —la mayoría de las acumulaciones de tumores registradas son demasiado pequeñas (a menudo menos de 10 casos) para que puedan tomarse en cuenta a la hora de sacar resultados concluyentes.

Aceptamos que existe una causa potencial en el ambiente y que se dispone de una hipótesis biológica verosímil que explique la inducción del cáncer. Incluso en esa situación el seguir la pista que nos remonte a la causa específica no es tarea fácil. "Los casos de cáncer son clínicamente inespecíficos; no podemos mirar a un caso de leucemia y decir de inmediato 'Buen, éste es un caso de leucemia producido por radiaciones'", explica Clark W. Heath, de la Sociedad Norteamericana del Cáncer. El problema se complica por la

latencia del cáncer. A diferencia de los brotes de las enfermedades infecciosas, que pueden asociarse con un contagio reciente, una acumulación de casos de cáncer podría tener sus raíces en una exposición de 10 o 20 años atrás.

"Reconstruir la historia de las exposiciones en las que un paciente ha sido protagonista constituye un reto científico imponente", comenta G. Iris Abrams, del norteamericano Instituto Nacional del Cáncer. "En principio, nadie es capaz de recordar todas las cosas a las que ha estado expuesto. Y cuanto más nos alejamos, tanto más inseguros estaremos acerca de la exactitud de la información sobre la exposición y tanto más probable será que las técnicas de medición hayan cambiado también." Abrams recuerda la necesidad de traer a colación muchos factores de riesgo, porque la enfermedad puede iniciarse por

una combinación de factores ambientales, genéticos y de otro tipo.

—Lori Miller Kase



LORRAINE PACE ha cartografiado la sorprendente acumulación de cáncer de mama en Long Island.

Genes y riesgo de cáncer

Mutaciones heredadas en estos genes confieren alta predisposición al cáncer. Se indica en rojo el tipo de neoplasia que más frecuentemente se asocia con la mutación del gen de la lista.

Cáncer de mama		
BRCA1	Mama, ovario	Supresor de tumores
BRCA2	Mama (ambos sexos)	Supresor de tumores
p53	Mama, sarcoma	Supresor de tumores
MLH1		
Cáncer de colon		
MSH2	Colon, endometrio, otros	Reparación de emparejamientos incorrectos
MLH1	Colon, endometrio, otros	Reparación de emparejamientos incorrectos
PMS1,2	Colon, otros	Reparación de emparejamientos incorrectos
APC	Colon	Supresor de tumores
Melanoma		
MTS1 (CDK52)	Piel, páncreas	Supresor de tumores
CDK4	Piel	Supresor de tumores
Cáncer neuroendocrino		
NF-1	Cerebro, otros	Supresor de tumores
NF-2	Cerebro, otros	Supresor de tumores
RET	Tiroides, otros	Oncógeno
Cáncer renal		
WT1	Tumor de Wilms	Supresor de tumores
WT2	Riñón, otros	Supresor de tumores
Retinoblastoma		
RB	Retinoblastoma, sarcoma, otros	Supresor de tumores

La dispar incidencia de cáncer de un grupo socioeconómico a otro traduce modos diferentes de vida. En las personas más desfavorecidas encontramos tasas mayores de cáncer de boca, estómago, pulmón, cuello de útero e hígado y de un tipo de cáncer esofágico (cáncer de células escamosas). De esa situación podríamos culpar a la pobreza, ya que va casi siempre de la mano de una incidencia mayor del hábito de fumar, consumo de alcohol, alimentación deficiente y exposición a ciertos agentes infecciosos; esta gavilla de factores, juntos, explican la mayoría de las patologías enumeradas.

Por contra, y sin que sepamos muy bien los motivos, entre los que distingan de rentas altas abundan más los cánceres de mama, próstata y cirrrosis. Defienden algunos que un excesivo desarrollo en los primeros años de la vida, resultante quizá de un ejercicio físico limitado y una alimentación copiosa, podría reforzar el riesgo de contraer tales tumores. Se trata de una hipótesis que no ha podido verificarse con rigor.

Las diferencias en la incidencia de cáncer observadas entre razas podrían fundarse también en factores socioeconómicos. Es verdad que hay diferencias raciales de origen genético, pero la variedad genética es mayor en el seno de una misma raza que de una raza a otra. En general, la mayoría de las diferencias entre negros blancos y asiáticos puede asociarse con la dieta, forma de vida y factores ambientales. En este sentido, por ejemplo, las mujeres japonesas que en su país un 25 por ciento del riesgo de padecer cáncer de mama que presentan las mujeres blancas en los Estados Unidos. Ahora bien, la incidencia de cáncer de mama en la tercera generación de mujeres estadounidenses de origen japonés es ya la misma que la del resto de las mujeres norteamericanas.

Mecanismos esquivos

Seguimos, pues, sin conocer buena parte de los mecanismos fisiológicos y genéticos específicos que los factores ambientales disparan para provocar el desarrollo del cáncer. Pero ello no obsta para que los científicos posean ya una idea aproximada de la proporción relativa que cabe poner en la inducción de tumores entre las distintas categorías de agentes carcinógenos. Con gran diferencia, en los países industrializados el consumo del tabaco y los hábitos

alimentarios ocupan puestos de predominio. En los países en vías de desarrollo, son más frecuentes los casos de cáncer relacionados con agentes infecciosos. Pero la difusión rápida y a escala mundial del hábito de fumar promete, también en esas regiones, convertir al tabaco en primera causa de mortalidad por cáncer.

Por muy útiles que sean para el establecimiento de medidas preventivas y objetivos en el campo de la sanidad pública, los datos epidemiológicos sobre la significación relativa de los carcinógenos ambientales no pueden predecir el sino de un individuo determinado. Este fumador empedernido quizá no padezca nunca un cáncer de pulmón y aquel portador invertebrado del virus de la hepatitis B podría permanecer libre de cáncer de hígado. Mucha gente de edad avanzada habrá tenido una vida sin problemas de salud, a pesar de vivir con dietas contraproducentes. En lo concerniente a otros factores abordados aquí, como la radiación ionizante o riesgos laborales, sólo una exposición extrema (o la presencia de genes mutantes en su genoma) cu-

locan a un individuo en grave peligro. La razón que explica esas aparentes paradojas es muy sencilla: para que un cáncer se desarrolle se requiere casi siempre la interacción de factores diversos.

Sabemos todavía muy poco sobre el comportamiento de esas interacciones que provocan que los carcinógenos en potencia pasen a la acción. El tiempo irá desvelando ese nexo crucial, ofreciéndonos un cuadro más completo sobre la naturaleza del cáncer.

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

CANCER: CAUSES, OCCURRENCE AND CONTROL. Dirigido por L. Tamatis. Oxford University Press, 1990.

CANCER EPIDEMIOLOGY AND PREVENTION. Dirigido por D. Schottenfeld y J. P. Fraumeni, Jr., Oxford University Press, 1996.

EPIDEMIOLOGY OF CANCER. Dimitrios Trichopoulos, L. Lipworth, E. Petridou y H.-O. Adami en *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. J. B. Lippincott (en prensa).