

Introducción a la Genómica

C O L E C C I Ó N

CARLOS DÍAZ COLLER

Textos de enseñanza de ciencias médicas

José Manuel Piña Gutiérrez
Rector

Introducción a la Genómica

Julia María Lesher Gordillo
Carlos Alfonso Tovilla Zárate



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

Leshner Gordillo, Julia María y Carlos Alfonso Tovilla Zárate
Introducción a la Genómica / Julia María Leshner Gordillo, Carlos Alfonso Tovilla
Zárate. – 1ª ed. – Villahermosa, Tabasco : Universidad Juárez Autónoma de
Tabasco, 2013
332 p. : il., (Colección: CARLOS DÍAZ COLLER, Textos de enseñanza de ciencias
médicas)

Incluye Referencias Bibliográficas: P. 297 - 301

ISBN UJAT: 978-607-606-128-2

I. Introducción a la Genómica - DNA I. TITULO II. AUTORES III. SERIE

L.C. QH447 L47 2013

Primera edición, 2013

D.R. © Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
Av. Universidad s/n. Zona de la Cultura
Colonia Magisterial, C.P. 86040
Villahermosa, Centro, Tabasco.

Queda prohibida la reproducción parcial o total del
contenido de la presente obra, sin contar previamente
con la autorización expresa y por escrito del titular, en
términos de la Ley Federal de Derechos de Autor

ISBN UJAT: 978-607-606-128-2

ISBN Miguel Ángel Porrúa: 978-607-606-136-2

Apoyo editorial: Francisco Morales Hoil
Ricardo Torres Baños
Corrección de estilo: Blanca Quiriarte Fernández

Hecho en Villahermosa, Tabasco, México

Prólogo

A partir de la publicación del trabajo científico de Watson y Crick en 1953, sobre la estructura de la doble hélice de DNA, el desarrollo de las ciencias genómicas ha sido vertiginoso y apasionante, comparando su desarrollo únicamente con las ciencias informáticas, acentuándose este desarrollo durante el siglo XXI. Hace algunas décadas resultaba difícil explicar; la base genética de muchas enfermedades, el poder manipular los genomas de los organismos para obtener variedades más eficientes o modificarlas de acuerdo a los intereses del ser humano, o bien como modelo genético para el estudio del funcionamiento de los genes.

Tomando en cuenta lo anterior, el propósito de este libro es introducir al lector interesado en las ciencias genómicas, a este vasto campo del conocimiento científico. Esta obra resulta apropiada para estudiantes tanto de licenciatura como de los primeros niveles básicos de posgrado; además proporciona al profesor flexibilidad para la selección de temas y nivel de profundización.

Este libro incluye desde conceptos básicos del DNA y RNA, además de la estructura y composición de los genes; la expresión y funcionamiento de los mismos. Introduce al lector al conocimiento de la Proteómica y la Fenómica como campos emergentes de las ciencias genómicas. Se analizan los cambios producidos al genoma por mutación, haciendo hincapié en la relación del ambiente y los mutágenos y su impacto en los organismos vivos. Haciendo énfasis en nuevas aplicaciones en áreas emergentes, como la Farmacogenómica, la Genómica Forense y la Bioinformática, para el análisis y comprensión de los genomas; así como en la solución de problemas que estas áreas demandan.

Esperamos que el público lector se vea beneficiado con esta obra y se apasione en el descubrimiento del nuevo campo de la Genómica.

Julia María Lesher Gordillo
Raymundo Hernández Martínez

Genómica

Carlos Alfonso Tovilla Zárate
Julia María Lesher Gordillo

La genómica es la disciplina que estudia los seres vivos, tiene como objetivo catalogar todos los genes que tiene un organismo, estudiar la organización y estructura de cada uno de ellos pero también descubrir la función, los mecanismos implicados en la regulación de la expresión y el modo en que unos genes interactúan con otros. El término genómica fue acuñado en 1986 por Tomas Roderik. Anteriormente, con las tecnologías disponibles de Biología Molecular se estudiaban la estructura y función de genes de manera individual (es decir uno a uno), sin embargo; la genómica permite el estudio en conjunto de los miles de genes, proteínas y metabolitos que constituyen un organismo así como las redes de interacciones que entre ellos se establecen.

La herencia genética de todos los organismos está determinada por su genoma, el cual consiste en una secuencia larga de ácidos nucleicos que proporcionan la información necesaria para construir el organismo. Siendo el genoma un conjunto completo de cromosomas de un organismo específico, de modo que comprende una serie de moléculas de ácido desoxirribonucleico cada una de las cuales contiene numerosos genes, mismos que físicamente pueden ser encontrados al dividir al genoma en estas moléculas funcionales de ácido nucleico. El genoma contiene el conjunto completo de información hereditaria para cualquier individuo.

La genómica se ha desarrollado en los últimos 10 años como consecuencia de la cantidad de información que se está generando y por tanto, ha sido necesario el desarrollo en paralelo de potentes herramientas bioinformáticas que permitan almacenar y analizar de forma conveniente los datos obtenidos.

A continuación se presentará de una forma muy general algunos conceptos básicos de genómica.

DNA y genes

El DNA es un polímero lineal formado por cuatro monómeros distintos. Poseen un esqueleto fijo, constituido por unidades repetitivas de azúcar-fosfato. Los azúcares son moléculas de desoxirribosa que dan nombre al DNA. Cada azúcar está unido a dos grupos por fosfato mediante dos diferentes enlaces. A cada desoxirribosa se puede unir una de estas cuatro bases: Adenina (A), Citosina (C), Guanina (G), o Timina (T).

El **DNA**, es la molécula que contiene la información genética y es el componente del la cual están hechos los genes. Por eso, para comprender el funcionamiento de los genes se ha de conocer al menos su estructura básica.

Es un dímero antiparalelo de hebras de ácido nucleico, está formado por unos nucleótidos que contienen el azúcar desoxirribosa, no presenta grupo hidroxilo en la posición 2'. Las cadenas de DNA están polimerizadas a través de un enlace fosfodiéster entre el grupo 3- hidroxilo de una subunidad y el grupo 5'-hidroxilo de la siguiente.

Por lo tanto, el DNA es una cadena lineal de desoxirribosa-fosfato con bases de purinas y pirimidinas unidas al carbono 1 de la subunidad de desoxirribosa.

Utilizando fotografías de difracción de rayos X del DNA tomadas por Rosalind Franklin, en 1953 James Watson y Crick propusieron una estructura para el DNA. Según este modelo, el DNA está formado por dos hebras entrelazadas, complementarias y unidas mediante enlaces de hidrógeno. Según dicha propuesta, el DNA está formado por dos hebras, enrolladas una con otra formando una estructura helicoidal diestra, con los pares de bases en el centro y las cadenas de desoxirribosilfosfato en la parte externa. La orientación de las hebras de DNA es antiparalela (es decir, las hebras discurren en direcciones opuestas).

Las bases de nucleótidos de una hebra interactúan con las bases de nucleótidos de la otra, formando pares de bases. La adenina empareja con la timina (A-T) y la guanina empareja con la citosina (G-C). Los pares de bases son planos y están orientados casi perpendicularmente al eje de la hélice. Cada par de bases está formado por un enlace de hidrógeno entre una purina y una pirimidina. La guanina forma tres enlaces de hidrógeno con la citosina y la adenina forma dos con la timina. A causa de la especificidad de esta interacción entre purinas y pirimidinas en las hebras opuestas del DNA, se dice que éstas tienen unas estructuras complementarias. La alta estabilidad de la doble hélice del DNA se debe a la fuerza combinada de los numerosos enlaces de hidrógeno formados

entre las bases de las hebras opuestas. Aunque los enlaces de hidrógeno entre las hebras están afectados por la temperatura y la fuerza iónica, a temperatura ambiente pueden ya formarse unas estructuras complementarias estables con largo de 6-8 nucleótidos.

El DNA es un polinucleótido, es decir, está formado por la unión de nucleótidos. Existen 4 nucleótidos diferentes: Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) y Citosina (C). Cada nucleótido, a su vez, está formado por una base nitrogenada, una pentosa (azúcar) y un grupo ortofosfórico, a través de este último componente se realizan las uniones entre nucleótidos. La unión del grupo fosfato tiene lugar en las posiciones 5' o 3' de la pentosa, lo cual hace que las cadenas estén orientadas (es decir posee dirección 5'→3'). El orden en que se sitúan los nucleótidos se denomina secuencia del DNA.

Con respecto a su localización intracelular la mayor proporción del DNA de las células de un organismo se localiza en los cromosomas del núcleo. El DNA de los cromosomas se encuentra empaquetado y asociado con proteínas histonas y no histonas. Cabe mencionar que no todo el DNA se encuentra en el núcleo debido a que una parte se localiza en mitocondrias.

El DNA se encuentra formando una estructura más compleja que consiste en dos cadenas como la anterior que se enlazan una con otra de manera complementaria y siempre se mantiene la siguiente regla las bases: A se une con T, y C con G. Estas dos cadenas, se enrollan una sobre otra formando la famosa doble hélice.

Un **gen**, también llamado unidad fundamental de la información genética que constituye una secuencia del genoma cuya función es dar origen a un producto (ya sea proteína o RNA), es un fragmento de DNA que contiene toda la información necesaria para la síntesis de un polipéptido, y ello lo hacen a través de un RNA intermediario. El siguiente diagrama muestra la forma en que la información genética se transmite desde el DNA hasta la proteína.



Por lo tanto, estos segmentos de moléculas de DNA que son los genes han de contener las señales o información necesaria para realizar estos procesos. Estos segmentos se pueden dividir en diferentes partes según un criterio de funcionalidad. Básicamente, un gen estaría constituido por 3 partes:

1. **Promotor:** que establece cuándo y en qué cantidad se transcribirá el gen.
2. **Región codificante:** el fragmento de DNA que determina la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada.
3. **Terminador:** que contiene las señales que determinan el término del proceso de transcripción, evitando que continúe hacia otros genes.

Todas estas señales son “leídas” y decodificadas por interacciones establecidas con proteínas específicas. Además, algunos genes contienen intrones, los cuales son secuencias dentro de un gen que son eliminadas en el procesamiento del RNA mensajero mediante un proceso denominado de “splicing” y que, por tanto, no están presentes en el mRNA maduro. El número, tamaño y posición de los intrones varía de un gen a otro. (3-4)

Librerías de DNA o genotecas

Una librería de DNA es una colección de clones de vectores que contienen fragmentos de DNA, diseñada de tal manera que mediante un determinado sistema de selección, se pueden llegar a separar los clones de interés.

Así pues, una librería de DNA podría ser una colección de fagos que contienen una muestra representativa de fragmentos de un genoma (librería genómica) o una colección de bacterias que contienen plásmidos en los que se ha clonado una muestra significativa de los genes que se transcriben en un determinado tejido.

Por tanto, para tener una librería deberemos tener:

- un sistema eficiente de clonaje de DNA, puesto que deberemos manejar un número considerable de clones.
- un sistema de selección de los clones que nos interesan de entre toda la colección.
- un sistema para la obtención de una muestra representativa del DNA a estudiar. Según cuál sea el propósito de nuestro estudio, existen diversos tipos de librerías:

- **librerías genómicas:** se elaboran a partir de DNA genómico de una especie que se digiere hasta un tamaño suficientemente pequeño para ser clonado en el vector de una manera más o menos al azar. La detección se realiza mediante hibridación de sondas.
- **librerías de cromosomas específicos:** como las anteriores pero a partir de DNA de determinados cromosomas purificados. La selección se realiza mediante hibridación de sondas.
- **librerías de cDNA:** se realizan a partir de mRNAs de un tejido particular. La selección se realiza mediante hibridación de sondas.
- **librerías de expresión:** como el anterior pero el clonaje se realiza de tal manera que la bacteria es capaz de transcribir y traducir la proteína codificada por el fragmento de DNA. La selección se realiza detectando la proteína en sí mediante anticuerpos, o bien alguna manifestación de su actividad.

Genómica estructural y funcional

Para su estudio la genómica se divide en dos grandes áreas:

Genómica estructural: ésta se ocupa de la caracterización física de genomas enteros, se centra en la organización y la secuencia de la información genética. Para secuenciar un genoma es necesario realizar un mapeo físico o genético de los cromosomas que forman ese genoma.

Genómica funcional: se caracteriza el transcriptoma que está constituido por el conjunto completo de transcritos, producido por un organismo, el proteoma o conjunto de proteínas codificadas por un genoma y el metaboloma o conjunto total de metabolitos de una célula, como consecuencia de la función de los RNA y proteínas. Aunque son muchos los métodos para estudiar el transcriptoma el más utilizado es el microarray de DNA, que permite el análisis simultáneo de la expresión de miles de genes. Esto será explicado a más profundidad en los capítulos sucesivos.

Proyectos genoma

A continuación explicaremos de manera breve el desarrollo del proyecto del genoma humano. Este se visualizó a partir de querer localizar los genes, lo cual puede definirse con un mapeo genómico. Dentro de los iniciadores y promotores de este proyecto se encuentra el profesor James Watson.

La secuenciación de un genoma completo obviamente permite descubrir la secuencia de todos los genes sin embargo el trabajo no es tan sencillo; por un lado, a partir de la secuencia total hay que identificar los genes, n segundo lugar, una vez identificados los genes hay que conocer como se regulan y cuál es su utilidad.

Existen autores que dada la complejidad de los genomas eucariotas aconsejan como primera aproximación, no abordar el estudio del genoma completo. Es preferible estudiar sólo una fracción del mismo, es decir aquellos genes que se están expresando en un momento determinado de la biología del organismo. Para ello se obtienen poblaciones de cDNAs que se secuencian de forma masiva para generar miles de secuencias parciales o ESTs (Expressed Sequence Tags). Estas secuencias cortas (300-500 pb) suelen ser suficientes para la identificación de los genes mediante comparación con las secuencias existentes en las bases de datos públicas (ej. Genbank, EMBL) utilizando para ello poderosos programas de análisis informático. La realización de bancos de ETSs de diferentes tejidos en diferentes situaciones fisiológicas conduciría al descubrimiento sucesivo de nuevos genes hasta elaborar un catálogo de la mayoría de los que se expresan en un ser vivo.

La aproximación anterior; sin embargo, no permitía identificar genes que se expresan a bajo nivel o en situaciones fisiológicas no consideradas. La única forma de tener un catálogo completo de los genes de una especie es secuenciar su genoma. Para ello el DNA genómico total se digiere con enzimas de restricción apropiadas para generar fragmentos de gran tamaño (100-300 kb) que se clonan en vectores apropiados (p.ej BACs, cromosomas artificiales bacterianos) para construir genotecas que contienen, al menos, una representación completa del genoma distribuida en decenas de miles de volúmenes diferentes que se pueden estudiar con detalle y secuenciar uno a uno.

Fue en 1978 que la revista *Science* dio a conocer la primera secuenciación de un genoma, el del virus del simio 40 (SV40) con 5.226 nucleótidos. En 1995 se publicó el primer genoma bacteriano en ser secuenciado, fue el de la bacteria *Haemophilus influenzae*. En marzo del 2000, se publicó el genoma completo de la *Drosophila melanogaster* gracias al consorcio público y la compañía Celera Genomics.

La era de la genómica

En el comienzo del tercer milenio estamos asistiendo a una revolución en el conocimiento y la comprensión de los procesos biológicos debido a la convergencia

de dos áreas de la ciencia que han tenido un desarrollo tecnológico enorme a finales del siglo XX: la Biología Molecular y la Informática (la bioinformática, esta ciencia se explicará en el capítulo 7). Un nuevo campo de investigación y desarrollo emerge a gran velocidad y sus aplicaciones empiezan a vislumbrarse en todos los ámbitos de la actividad humana relacionados con la Biología como la Medicina, Farmacología, Ganadería, Agricultura y Silvicultura, Medio Ambiente, entre otros. ¡La era de la genómica ha comenzado!

En el mes de febrero de 2001, la revista *Nature* 409, 860-921 (2001), publica el primer borrador del genoma humano, a este logro hay que añadir el desciframiento en los últimos años de muchos tipos de genomas.

El proyecto del genoma humano

En general, el genoma es el conjunto completo de los genes de una especie. En última instancia se define por la secuencia completa de DNA, aunque por una cuestión práctica podría no ser posible identificar cada gen inequívocamente solo con base en la secuencia. El número de genes del genoma puede ser identificado directamente al definir marcos de lectura abiertos. Mediante un mapa genético (o de ligamiento) se identifica la distancia entre mutaciones en cuanto a frecuencias de recombinación. Un mapa de ligamento puede construirse midiendo la recombinación entre sitios en el DNA genómico. Sin embargo, un mapa de restricción se construye dividiendo el DNA en fragmentos con enzimas de restricción y midiendo las distancias entre los sitios de división.

Se conoce actualmente que el genoma humano contiene 22 000 a 28 000 genes distintos que codifican proteínas y se localizan en 23 pares de cromosomas. Estos genes diferentes representan secuencias de DNA exclusivas que existen en copias únicas o, a lo sumo, a razón de unas pocas copias por genoma. En el genoma también existen varios tipos de secuencias repetidas de DNA. Éstas se dividen en dos clases principales: secuencias escasamente repetitivas (<10 copias por genoma) y secuencias altamente repetitivas (>10 copias por genoma).

Algunas secuencias de DNA escasamente repetitivas están formadas por genes que especifican RNA ribosómico o proteínas histonas que las células necesitan en grandes cantidades. Otras secuencias escasamente repetitivas no poseen ninguna función conocida útil, aunque es posible que participen en la asociación de hebras de DNA y en las reorganizaciones cromosómicas durante la meiosis.

La transcriptómica: aplicación en enfermedades comunes

Julián Ramírez Bello

Introducción

A principios del 2001 se publicaron dos trabajos independientes que reportaron que el número de genes encontrados en el genoma humano era de aproximadamente de 27,000.^{1,2} Unos años más tarde (finales del 2004), otro reporte indicaba que el número de genes apenas alcanzaba a los 22,287.³ Estos datos nos indican que el número de genes encontrados en el genoma humano es muy bajo y abre nuevas perspectivas y posibilidades para estudiar a otros mecanismos moleculares que generan a los aproximadamente 34,214 transcritos diferentes, es decir, apenas hay 1.54 transcritos por gen.³ Estos transcritos o ácido ribonucleico mensajero (RNAm) son las moléculas encargadas de “llevar” el mensaje de la molécula de la herencia; el DNA del núcleo al citoplasma en donde se va a traducir dicha información. El estudio de la expresión génica es de suma importancia debido a que los RNAm están involucrados en diversas etapas del desarrollo, diferenciación, proliferación, regeneración, enfermedad de células, tejidos, órganos, etc. Hasta hace apenas algunos años el estudio de la expresión génica era abordado mediante metodología que involucraban a unos cuantos genes o a genes individuales, actualmente con los nuevos desarrollos tecnológicos de última generación y con los abordajes de expresión del genoma completo en donde se evalúan bajo cierta condición ambiental o patológica los perfiles de expresión de miles de genes en un solo experimento se han podido identificar a una gran cantidad de genes involucrados principalmente con rasgos patológicos. Ahora uno de los principales problemas generados por esta herramienta molecular es interpretar los miles de resultados, después de la interpretación de estos resultados se pretende determinar y generar un panorama más amplio acerca de los aspectos moleculares involucrados en dichas patologías y en un futuro no lejano se espera que puedan tener un efecto directo en la prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los pacientes.

Características del RNA

Tanto el DNA como el RNA son los ácidos nucleicos encargados de almacenar y transmitir la información genética de generación en generación. A diferencia del DNA, el RNA cumple diversas funciones biológicas dentro de una célula, tejido, órgano, sistema o individuo. Actualmente, se han descrito una gran cantidad de RNAs que cumplen diversas funciones biológicas en la célula que incluyen transmisión de la información genética, regulación génica, unión a ligandos, catálisis, desarrollo, proliferación, hematopoyesis y apoptosis, entre otros, dentro de las células.⁴⁻⁶ Entre estos RNAs se encuentran los RNA ribosomales (RNAr), RNA de transferencia (RNAt), RNAm, microRNAs (miRNAs), RNAs de interferencia (RNAi) y cada uno de estos cumplen diversos procesos biológicos en una célula-tejido-órgano u organismo. Estas funciones incluyen “llevar” la información del DNA del núcleo al citoplasma, sin embargo, un número de funciones diferentes se llevan a cabo, estas incluyen formar parte de componentes celulares como los ribosomas, o funcionales como enzimas, regulación de la expresión y traducción génica, transporte de aminoácidos, entre otras. Tanto el DNA como el RNA están formadas por un azúcar, una base nitrogenada y un grupo fosfato. Sin embargo, existen algunas diferencias entre estas moléculas (Tabla 1). Una de ellas está en el azúcar, ya que en el RNA se encuentra una ribosa en vez de desoxirribosa (de aquí el nombre de ácido ribonucleico) (Figura 1), mientras que la base nitrogenada es el uracilo y no una timina que se encuentra en el DNA (Figura 2). Otras características de los RNAs son las siguientes: las hebras son sintetizadas como una sola cadena y están formadas por los nucleótidos A, C, G, U, unidos entre sí por enlaces fosfodiéster (Figura 3), debido a esto la conformación que pueden tomar los diversos RNAs dentro de las células es muy compleja y diversa, mientras que el DNA siempre se encuentra en la célula en forma de hélice de doble cadena. La replicación del DNA va en una orientación 5->3, la transcripción también lleva esta misma orientación; 5->3. La expresión génica a su vez, es un fenómeno muy complejo y una gran mayoría de los genes expresados en tejido específico, solo se expresan bajo cierto estímulo o factor ambiental, es decir, solo bajo ciertas condiciones y en un tejido específico se puede expresar cierto gen.

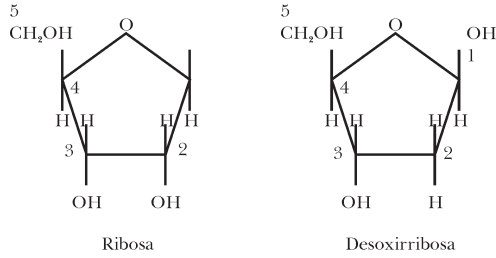


Figura 1. El RNA tiene un azúcar ribosa que se diferencia de la desoxirribosa (que está en el DNA) por la adición de un OH en el carbono 3.

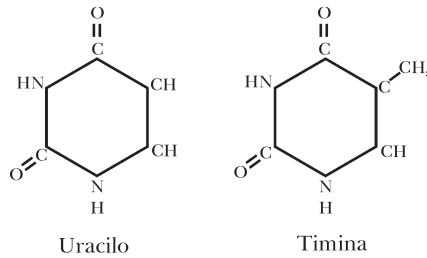


Figura 2. El RNA está formado por la base nitrogenada uracilo en lugar de timina que se encuentra en el DNA

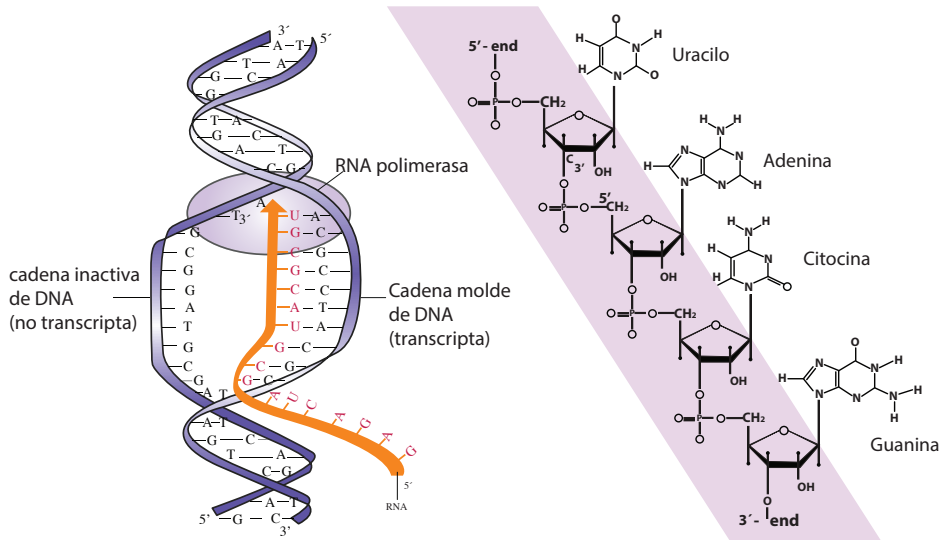


Figura 3. Secuencia corta de RNA. El RNA está formado por un ribosa, una base nitrogenada (U, G, C o T), y un grupo fosfato.

Tabla 1.
Tabla comparativa de las diferencias entre DNA y RNA

<i>Característica</i>	<i>DNA</i>	<i>RNA</i>
Cadena	2	1
Azúcar	Desoxirribosa	Ribosa
Bases nitrogenadas	Adenina, timina, guanina, citosina	Adenina, uracilo, guanina, citosina
Complementaridad	DNA-DNA A-T, T-A, G-C, C-G	RNA-RNA A-U, U-A, C-G, G-C
Función	Contiene genes y almacena la información genética	Lleva la información genética del núcleo al citoplasma, forma parte de organelos (ribosomas) o proteínas (ribozimas), transporta a los diferentes aminoácidos, regula la expresión y traducción, etc.
Ubicación	Núcleo y mitocondria de todas las células	Los genes tienen expresión tejido específico

Estructura y plegamiento del RNA

A diferencia del DNA humano encontrado en el núcleo y en la mitocondria, la mayoría de los RNAs son sintetizados como una sola hebra de nucleótidos, dicha hebra está formada por los nucleótidos A, G, C y U (el DNA reemplaza la timina por el uracilo), inmediatamente iniciada la síntesis de los RNAs, éstos deben sufrir un plegamiento molecular que les permitirá tener una estructura estable e iniciar prácticamente todas sus funciones celulares. El plegamiento de los RNAs comprende un ordenamiento espacial que es de suma importancia para realizar prácticamente cualquier función celular de los RNAs en las células. Los diferentes RNAs están formados por secuencias cortas de pares de bases Watson-Crick y son interrumpidas comúnmente por estructuras denominadas bucles u otras estructuras más complejas que estabilizan a la molécula. Comúnmente, el RNA es clasificado de acuerdo a su estructura primaria, secundaria y terciaria, la primera hace referencia a una secuencia ordenada de nucleótidos, la segunda a estructuras en donde intervienen nucleótidos no apareados, aquí se encuentran una gran cantidad de estructuras como asas, bucles, horquillas, tallo-bucle, etc.,

finalmente, la estructura terciaria es una estructura más compleja e involucra más de una estructura secundaria, aquí interaccionan éstas y su adaptación molecular refleja la funcionalidad biológica de los diferentes RNAs en un organismo.^{7,8} Las diferentes conformaciones adquiridas por el plegamiento espacial de los RNAs son de vital importancia ya que estas ayudan a mantener su estabilidad molecular debido en gran parte a la unión de diversas proteínas al RNA, esta interacción evita que los diferentes RNAs sean degradados rápidamente por RNasas.⁹

Generalidades del RNAm

Comúnmente los diversos RNAs son clasificados en RNAs no codificantes o reguladores y codificantes o los que producen a los RNAm. Para que las células lleven a cabo cada una de sus funciones, primero se debe de copiar o “transcribir” parte del DNA que lleva dicha información genética, este proceso se denomina transcripción génica (Figura 4), y es un fenómeno biológico que está regulado de manera compleja con diversas proteínas. Así, la transcripción génica implica entre otros fenómenos el remodelamiento de la cromatina, la apertura de la doble hebra de DNA, la unión de factores de transcripción generales y específicos de la transcripción, la unión de la RNA polimerasa II (para los genes que sintetizan proteínas) (Figura 5).¹⁰ Se ha calculado que solo el 2% del total de la secuencia del genoma humano está involucrado en la codificación de las proteínas.³ Mientras, otros autores han reportado que aproximadamente el 90% del genoma es transcrito, estos datos sugieren que la mayoría de los genes transcritos son RNAs que cumplen diversos procesos celulares como por ejemplo la regulación de procesos biológicos anteriormente mencionados y no están involucrados en la síntesis de proteínas.¹¹ En general, los RNAm son cortos y pueden abarcar apenas unas cuantas miles de pb. Su expresión depende del estímulo ambiental o enfermedad, mientras que su vida media depende de una cola de poliadeninas (poliA) que se encuentra en la región 3´UTR (región no traducida) del RNAm y de la estructura que el RNAm pueda adoptar, así como de la unión de diversas proteínas que las protegen de su degradación.

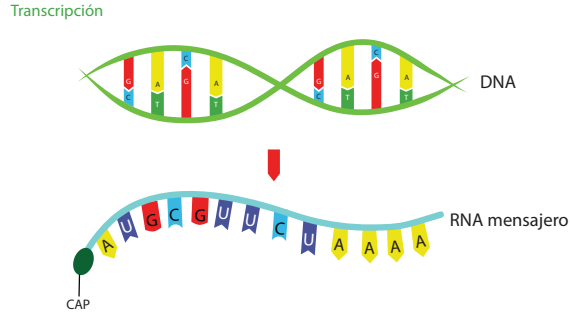


Figura 4. Transcripción génica. El RNA se copia o transcribe a partir de una cadena molde de DNA, la orientación de la transcripción es 5' → 3'.

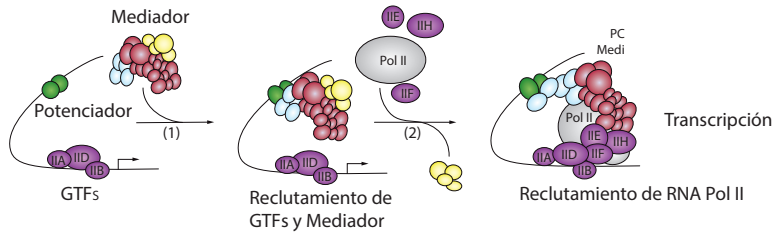


Figura 5. Regulación de la transcripción génica. El proceso de transcripción en eucariotes es altamente regulado y complejo, en dicho proceso se requiere de la reorganización de la cromatina, apertura de la hebra de DNA, y de la unión de varias proteínas denominadas factores de transcripción al promotor del gen.

La transcripción génica

La regulación temporal y espacial de la expresión génica es un determinante fundamental en la respuesta celular a señales ambientales y fisiológicas particulares. Los RNAm que se transcriben a partir de genes que producen proteínas son copia fiel de la cadena de DNA molde que lleva una secuencia codificante, en este proceso se requiere de una serie de proteínas que están implicadas en la síntesis del RNAm, elongación y terminación de la transcripción. El paso más importante de este evento es el inicio de la transcripción y este comienza en la región 5' de un gen, en esta región se encuentra la región reguladora de la transcripción la cual se denomina promotor, dichos promotores son comúnmente divididos en núcleo y elementos próximos al promotor. El núcleo o promotor mínimo, es la secuencia de nucleótidos mínimos necesarios para iniciar la transcripción *in vivo*,

en humanos se localiza aproximadamente en la posición -45 a -20 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, mientras que los elementos próximos al promotor pueden ayudar a regular de manera más específica la transcripción génica. En el promotor mínimo, se encuentran secuencias consenso que son reconocidas por una gran cantidad de proteínas que incluyen a la proteína de unión a la caja TATA (*TATA binding protein; TBP*), factores de transcripción generales (*TBP Associated Factor; TAFs*) y RNA polimerasa II (Figura 6).¹² La RNA pol II es un complejo multiproteínico de alto peso molecular, pero no se reconoce al promotor y no puede iniciar la transcripción sin la ayuda de los factores generales de la transcripción (Figura 7).¹¹ Todo este complejo de pre-iniciación tiene la función de reconocer a secuencias consenso como la caja TATA ubicada apenas unas cuantas bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción y de unir a la RNA polimerasa II al promotor (Figura 7). En los elementos próximos al promotor se encuentran secuencias consenso que son importantes para potenciar (enhancer) o inhibir (silencers) la transcripción génica, por ejemplo, la caja GGGCGG la cual está presente en la mayoría de los promotores eucariotes está localizada en los primeros 100 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción y es reconocido por Sp1.¹³ Otro elemento, es la caja CCAAT, la cual funciona como un enhancer, su localización generalmente está alrededor de 75 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción y es reconocido por CTF/NF1.^{14,15} Alteraciones genéticas en dichas secuencias consenso ubicadas en el núcleo del promotor o en los elementos próximos, pueden generar alteración a nivel de expresión, llevando a una sobreexpresión o subexpresión génica.



Figura 6. Promotor mínimo o núcleo del promotor. Esta región es la mínima necesaria para iniciar la transcripción, secuencias consenso importantes de reconocimiento a proteínas y factores de transcripción se encuentran en esta región. BRE; elemento de reconocimiento al factor de transcripción IIB (TFIIB), TATA; sitio de reconocimiento para la proteína de unión a la caja TATA, INR; Iniciador de la transcripción.

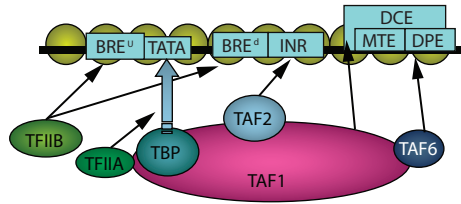


Figura 7. La transcripción en eucariotes. La unión y reconocimiento de los factores generales de transcripción, así como la unión de factores asociados (TAFs) a la proteína de unión a la caja TATA es un proceso sumamente complejo y regulado, estas proteínas ayudan a la RNA polimerasa II a unirse con el DNA e iniciar la transcripción génica.

Corte y empalme (splicing alternativo)

Cuando los RNAm son recientemente sintetizados (pre-RNAm), estos van formados por regiones intrónicas que se tienen que eliminar para dejar a RNAm maduros, así los pre-RNAm sufren varios rearrreglos genéticos para generar RNAm maduros o secundarios, el producto final es un RNAm sin intrones. Brevemente, el pre-RNAm es transcrito del DNA en el núcleo, el siguiente paso es eliminar a los intrones, que son secuencias de nucleótidos que no codifican a proteínas, pero que son importantes en la regulación génica, en estas regiones se encuentran secuencias consenso implicadas en el splicing alternativo, además de otras secuencia como silencers y enhancer intrónicos y exónicos que también son importantes para la generación de isoformas génicas.¹⁶ Una vez que los intrones son eliminados, los exones son ligados (Figura 8). Es así, como a partir de un solo gen y a través de splicing alternativo se generan varias isoformas del RNAm y de las proteínas.¹⁷ Las proteínas implicadas en el splicing alternativo se encuentran en el espliceosoma, este complejo multi-megadalton está constituido por una maquinaria de 6 ribonucleoproteínas denominadas U1-U6, y cada una de ellas juega un papel fundamental en este proceso.¹⁷ Por ejemplo, la ribonucleoproteína U2 encontrada en todos los eucariotes es la encargada de remover a los intrones más comúnmente encontrados en los intrones de eucariotes. Brevemente, los intrones de los pre-RNAm son removidos a través de dos pasos de transesterificación. En el primer paso, el punto de ramificación (branch) en donde se encuentra una adenosina ubicada en los intrones, sufre un ataque nucleofílico sobre el sitio de splicing 5', resultando en la ruptura del pre-RNAm y en la unión del extremo 5' del intrón al sitio de ramificación

donde está la adenosina. El segundo paso implica al sitio de splicing 3', el cual es atacado por el grupo 3' OH del extremo 5' del exón (Figura 9).¹⁷ Finalmente, los intrones son liberados y uno o varios RNAm maduros son generados a partir de un solo gen, prosiguiendo así a la síntesis de proteínas en el citoplasma celular

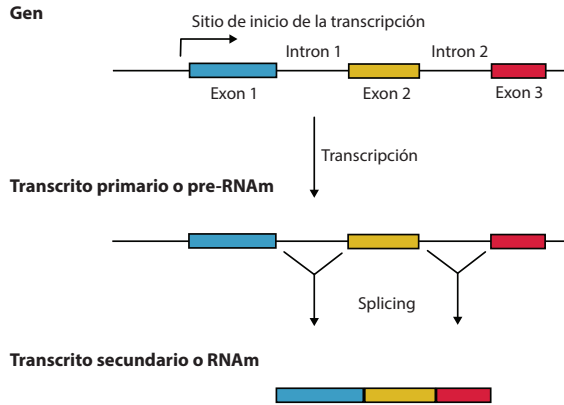


Figura 8. Splicing alternativo. Este proceso es de suma importancia para generar isoformas de los genes, así, este proceso implica eliminar a los intrones de los pre-RNAm y producir RNAm maduros.

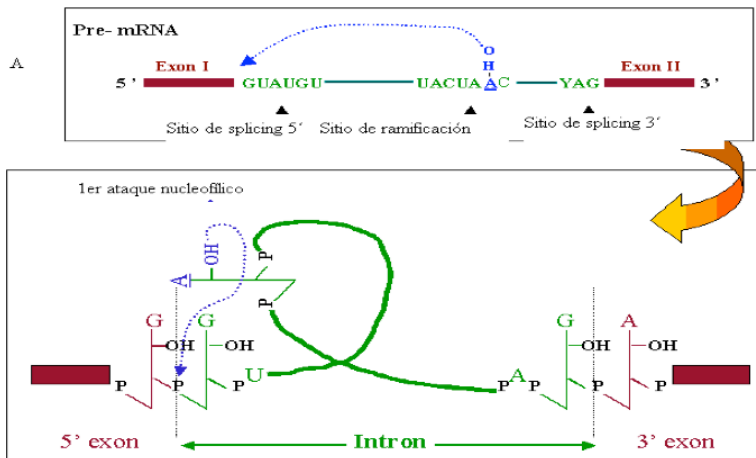


Figura 9 (A). Proceso molecular del splicing alternativo, paso 1 de la transesterificación.

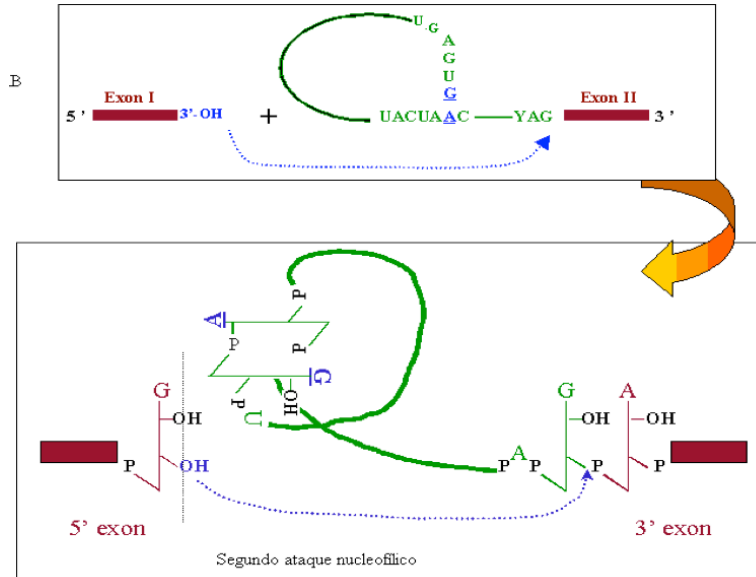


Figura 9 (B). Proceso molecular del splicing alternativo. Segundo paso de la transesterificación necesaria para eliminar a los intrones de los pre-RNAm, los sitios de ramificación (sobre todo la adenosina) y los sitios de splicing 5' y 3' son importantes para la eliminación de los intrones (ver texto).

Traducción del RNAm

La estructura general del RNAm maduro se muestra en la Figura 10, brevemente, el RNAm está formado por un extremo 5' y 3'. En el extremo 5' hay una estructura denominada 5'UTR o región 5' no traducida, aunque sí se transcribe (*untranslated region; UTR*), seguida por la secuencia codificante que va a originar a un péptido o proteína, finalmente hay una región 3'UTR involucrada en la estabilidad del mensajero, cada parte del RNAm juega un papel fundamental en la regulación de la traducción, en la codificación del péptido o proteína y en la estabilidad del RNAm.¹² Después de iniciarse la síntesis del RNAm hay algunas estructuras que se le añaden, una de ellas es la 7 metilguanosa, que es un nucleótido modificado de la guanina que se agrega en el extremo 5', mientras que en el 3' UTR se le agrega una cola de poliA mediada por una señal de poliadenilación, esta estructura es importante y evita la degradación del RNAm por medio de RNAsas, aumentando así su vida media en el citoplasma. El RNAm sintetizado en una orientación 5'→3' se une a los ribosomas (organelo formado por dos subunidades en los eucariotes; subunidad mayor 60S y menor 40S) por su

extremo 5' y comienza a traducirse en dichos organelos ubicados en el citoplasma de la célula de forma libre o unidos al retículo endoplásmico rugoso (Figura 11). Una vez que el RNAm es reconocido por el ribosoma, los RNAt comienzan a transportar a los diferentes aminoácidos y la síntesis de proteínas comienza. En la célula eucariótica hay aproximadamente 31 tRNAs, muchos de ellos transportan al mismo aminoácido o a diferentes aminoácidos (las proteínas comúnmente están compuestas por una combinación de 20 diferentes aminoácidos que se muestran en el código genético de la figura 12, el código genético es degenerado, porque más de un codón codifica para un mismo aminoácido). El tRNA está formado por 4 estructuras que tienen funciones específicas, el brazo aceptor de aminoácido y tres bucles, de éstos uno reconoce al ribosoma, otro es reconocido por la aminoacil-tRNA sintetasa que une a los aminoácidos al tRNA y otro más involucrado en presentar el anticodón y complementarse con un codón del RNAm, que lleva el aminoácido que corresponde a la secuencia complementaria del RNAm (Figura 13). El RNAm puede pasar a través de un solo ribosoma o a través de un agregado de polirribosomas y producir varias moléculas de proteínas (Figura 14). La traducción de las proteínas se divide en tres pasos: el inicio, la elongación y la terminación de la traducción, en cada etapa hay varias proteínas que juegan un papel principal en dicho proceso, como los factores de inicio, de elongación y de terminación; además, en el RNAm hay codones que indican que la síntesis de proteínas debe iniciar o terminar (codón de inicio de la traducción; AUG y de terminación; UAA, UAG y UG).

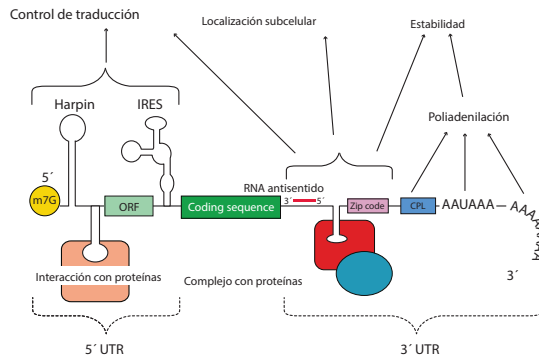


Figura 10. Estructura general de un RNAm maduro. La estructura de un típico RNAm eucariote está constituido por una estructura de gorro o CAP en el extremo 5' UTR, además de la secuencia 5' UTR, que regula eventos de la traducción, la región codificante sin intrones, finalmente tiene una estructura 3' UTR, que regula la vida media del RNAm, además se le une a este extremo una cola de poliA, que no está en la estructura del gen.

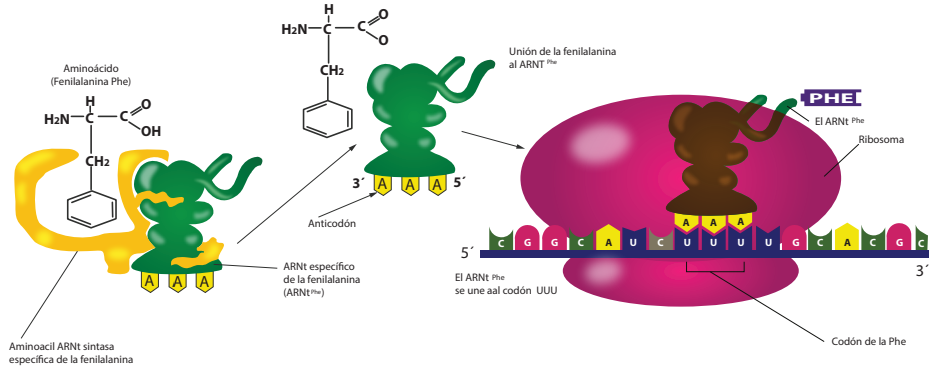


Figura 11. Traducción de una RNAm. La síntesis de proteína comienza cuando el RNAm se une a los ribosomas por su extremo 5', posteriormente comienza a desplazarse y los aminoácidos son agregados por sus transportadores; los tRNAs que llevan un anticodón que es complementario al codón del RNAm, así los tRNAs unen aminoácidos específicos y se sintetiza un péptido o una proteína.

	U	C	A	G	
U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } SER UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } UAG }	UGU } Cys UGC } UGA } UGG } Trp	U C A G
C	UUU } UUC } Leu UUA } UUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gin CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG } Met	ACU } ACC } Thg ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Alo GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly CCA } GGG }	U C A G

Figura 12. Código genético. El código genético en humanos está formado por una secuencia de tripletes o codones que codifican a los diferentes aminoácidos que forman a un péptido o proteína. Este código genético es degenerado, porque hay más de un codón para el mismo aminoácido.

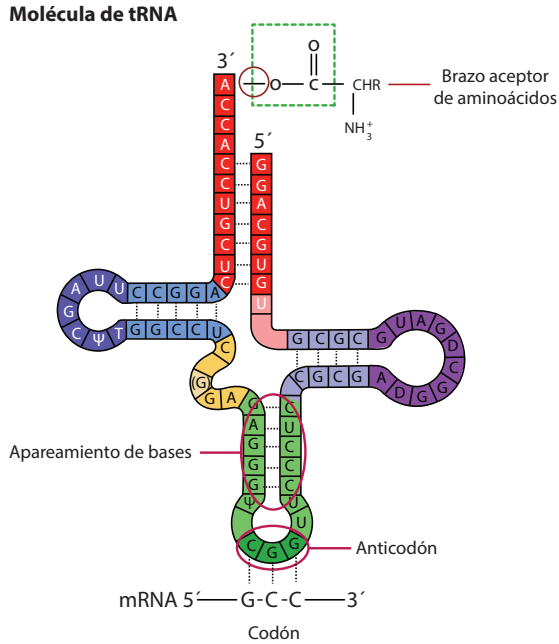


Figura 13. Estructura de un tRNA. Los tRNAs están formados por cuatro estructuras básicas, que tiene funciones específicas en el reconocimiento del ribosoma, del anticodón y en la transferencia de los aminoácidos.

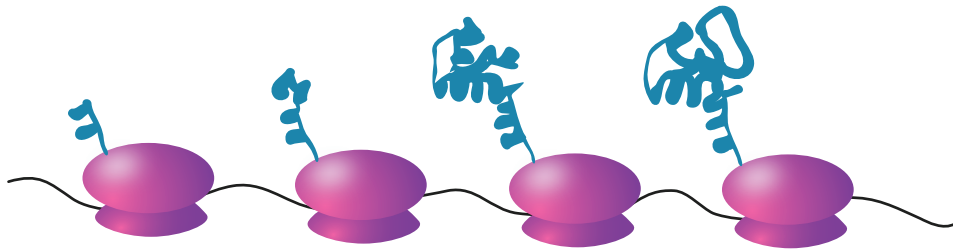


Figura 14. Polirribosomas. Estos organelos celulares están implicados en la síntesis de proteínas, de hecho el agregado de estos ribosomas potencializa la cantidad de proteína que se origina de un solo RNAm.

Variantes genéticas que afectan al RNAm

Los recientes estudios realizados en el genoma humano han identificado que variantes genéticas comunes (polimorfismos) distribuidas a través de todo el genoma pueden tener una influencia en la biología de la molécula del RNAm, ya sea a nivel de expresión, traducción, splicing alternativo o estabilidad del mensajero.^{16,18-22} En el genoma humano se han identificado varios tipos de polimorfismos que tienen una frecuencia mayor al 1% en individuos sanos, los cuales incluyen a los repetidos cortos en tandem (STRs), repetidos en tandem de número variable (VNTRs), inserciones/delecciones de una o más pb (INDEL), los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y las variantes en el número de copia (CNVs) (Figura 15).²³⁻²⁴ Los polimorfismos más ampliamente distribuidos en el genoma humano son los SNPs y las CNVs. Los SNPs pueden tener una distribución de 1 en cada 300 pb, y se ha propuesto que pueden alcanzar hasta aproximadamente 20 millones de ellos en el genoma humano.²⁵ Los SNPs que tienen una implicación en la regulación de la expresión génica del RNAm, traducción, splicing alternativo y estabilidad de la proteína se denominan SNPsr (SNPs reguladores). Por otro lado, los CNVs son segmentos de DNA que tienen un tamaño igual o mayor a 1 kb e incluyen inserciones, delecciones, duplicaciones y que han sido recientemente reportadas en el genoma humano.²⁴ Debido a que los SNPs están distribuidos ampliamente a través de todo el genoma humano y a través de la estructura de un gen pueden causar susceptibilidad a desarrollar diversas enfermedades, como obesidad, mellitus tipo 2 (DMT2), hipertensión arterial (HTA), enfermedades autoinmunes, como lupus eritematoso sistémico (LES) o artritis reumatoide (AR), entre otras.^{18,21} Los SNPsr pueden afectar los niveles de expresión génica, ya que pueden crear o destruir sitios de unión a factores de transcripción llevando a una subexpresión o sobreexpresión génica.^{18,21-22,26} Este efecto se ve reflejado en la creación de un sitio de unión al factor de transcripción Oct-1 generado en el promotor del gen *TNF- α* , ubicado específicamente en la posición -376G/A.²⁷ El inicio de la síntesis de proteínas está regulada por diversas estructuras que forman a los RNAm, una de ellas es la de los sitios de entrada al ribosoma (IRES), los múltiples codones de inicio de la traducción AUG, etc., una vez que el RNAm se une a la subunidad 40S del ribosoma comienza su traducción.^{28,29} Esta región se ha asociado a varias patologías entre las que se incluyen a la trombocitemia hereditaria. De hecho, la región 5'UTR del gen involucrado en esta patología es altamente regulado por

inhibición de los marcos de lectura abierto (ORFs), cuando hay una mutación el RNAm es traducido eficientemente y produce esta patología.²⁹ En los intrones también existe una gran cantidad de elementos regulatorios que influyen en la formación de nuevas isoformas del RNAm y por lo tanto de proteínas, en esta región comúnmente se encuentran los sitios aceptores y donares de splicing, así como los enhancer y silenciadores exónicos e intrónicos, alteraciones en estas secuencias causadas por SNPs pueden generar susceptibilidad a diversas enfermedades produciendo nuevas isoformas asociadas a ciertos fenotipos clínicos, un ejemplo de esto lo representa un SNP ubicado en el gen que codifica a la 3 hidroxil-3-metilglutaril -coenzima A reductasa (*HMGCR*), el cual genera nuevas isoformas que se asocian a niveles altos de colesterol-LDL.¹⁹ Por otro lado, se ha reportado que la inactivación de un silenciador exónico por un SNPr causa susceptibilidad a esclerosis múltiple por la inclusión de un exón.^{16,30} Finalmente, la región 3'UTR se ha asociado con regulación de la traducción, localización y estabilidad del RNAm, SNPs encontrados en esta región se han asociado con una mayor o menor estabilidad del RNAm en el citoplasma.

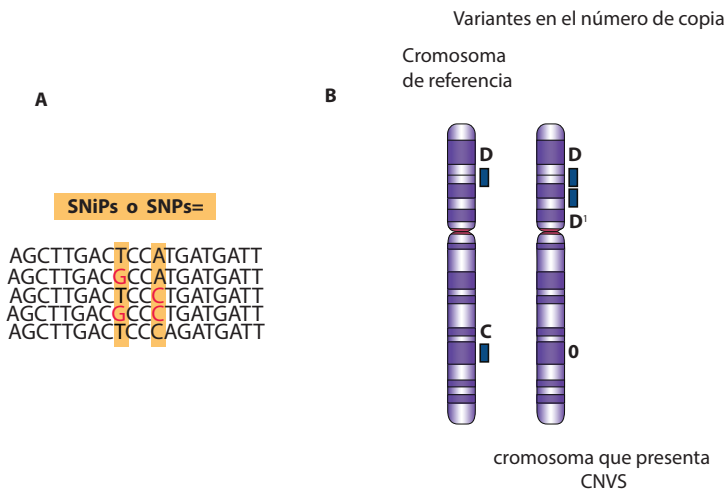


Figura 15. Polimorfismos comunes encontrados en el genoma humano. Recientemente, con la secuenciación del genoma humano se han descrito millones de SNPs y un número muy alto de CNVs. Estos polimorfismos son comunes y representan cambios de un sólo nucleótido (SNPs), o duplicaciones o deleciones mayores a 1 kb (CNVs). En la figura 14A.se muestra el cambio en una sola posición en la secuencia de DNA, mientras que en B se muestra una CNV, específicamente hay una D en el cromosoma de referencia, mientras que en el otro homólogo hay una duplicación, o una C en el cromosoma de referencia y una deleción en el homólogo.

De la expresión génica de genes aislados a la transcriptómica

Desde la introducción de esta tecnología en años recientes, el panorama científico ha cambiado drásticamente. El objetivo de esta tecnología de última generación es identificar una cantidad impresionante de genes asociados a diversos fenotipos, enfermedades, etc., esta metodología nos ha ayudado a analizar la expresión de miles de genes (transcriptoma) en un sólo experimento bajo cierto fenotipo o enfermedad, así los análisis clásicos de RT-PCR empleada para analizar un gen o pocos genes se está olvidando rápidamente (Figura 16). Es con esta tecnología, como ha nacido la era de la genómica funcional, transcriptómica, proteómica, fenómica, metabolómica, nutrigenómica, etc. Ahora, los científicos se encuentran con el reto de poder interpretar la gran cantidad de resultados arrojados por esta tecnología de punta y de alto rendimiento. A pesar de este gran avance, esto representa un gran problema para los países en vías de desarrollo, pues estas metodologías implican una gran cantidad de recursos económicos, técnicos y científicos. Aún en países desarrollados, la gran cantidad de datos que se está generando de éstos estudios, impide llegar a conclusiones precisas, debido a que estos experimentos generan una cantidad enorme de factores de confusión como por ejemplo, modelo de estudio, línea celular, estímulo, patología, heterogeneidad clínica, genética y molecular, software, etc. Así, en diferentes estudios donde se analiza la misma patología se encuentran diferentes genes sobre-expresados o subexpresados, y los resultados no son replicados. A pesar de esto, los pocos resultados han servido para hacer el análisis global de los genes que alteran su expresión bajo cierta condición o enfermedad. En un futuro, se pretende que estos datos puedan ser empleados como biomarcadores moleculares, o como blancos clínicos o moleculares, ya sea en cáncer, DMT2, obesidad, enfermedades autoinmunes, etc.,³¹ además; con estos estudios se busca identificar a moléculas clave que pueden ser utilizadas como marcadores de susceptibilidad, prevención, diagnóstico y pronóstico. De esta manera se trata de hacer una medicina genómica personalizada.

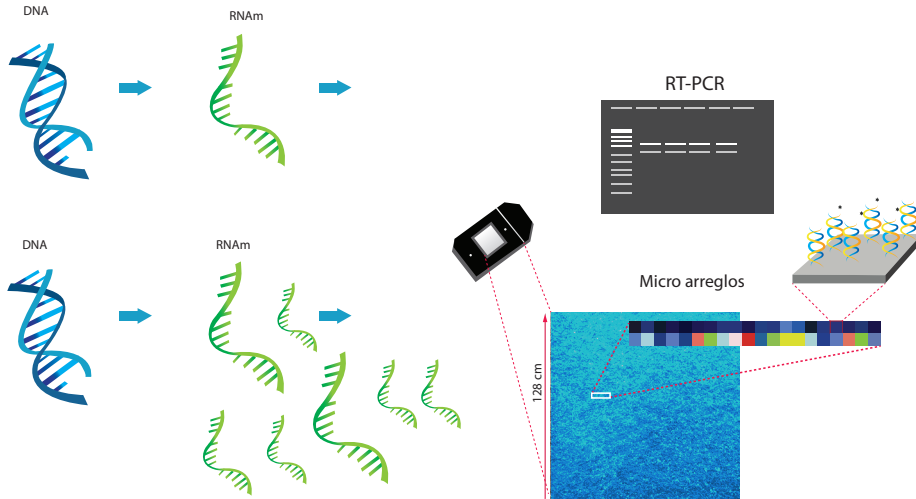


Figura 16. Herramientas empleadas en genética y genómica funcional. A) La expresión de genes hace algunos años se realizaba en uno o unos cuantos genes que se expresaban bajo cierta condición. B) Actualmente se ha implementado el análisis de expresión del transcriptoma completo a través de microarreglos de expresión.

Herramientas moleculares empleadas en transcriptómica

Diversas herramientas moleculares han sido empleadas para el análisis de expresión génica, entre ellas se encuentran a la RT-PCR de punto final o en tiempo real, northern blot, análisis serial de la expresión génica (SAGE), display diferencial, microarreglos de expresión punteados y de oligonucleótidos de alta densidad.³¹⁻³² Cada una estas técnicas presentan ventajas y desventajas, sin embargo, solo los microarreglos punteados y de alta densidad diseñados principalmente por Affymetrix e Illumina pueden analizar miles de genes en un chip que alcanza un tamaño de apenas unos cuantos centímetros de longitud, de éstos dos, el último puede analizar la expresión génica de un mayor número de genes (Figura 17). Estos últimos microarreglos son bastante bondadosos, altamente reproducibles, sensitivos y requieren pequeñas cantidades de RNAm. Así, desde su introducción hace más de una década, la investigación en los análisis de expresión génica ha cambiado completamente el panorama científico debido al gran salto que se ha dado con la transcriptómica (técnicas moleculares que analizan los perfiles de expresión del transcriptoma completo).

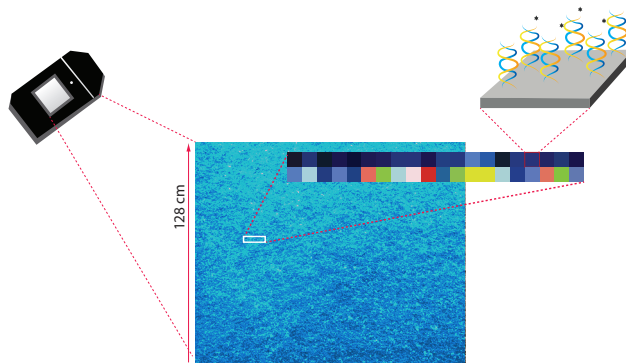


Figura 17. Microarreglos de expresión. Esta metodología está basada en miles de pozos ubicados en una plataforma de vidrio o de plástico, cada pozo puede tener oligonucleótidos de DNA sintetizados para cada gen expresado en una célula, tejido, etc. Un laser interpreta a los genes que se unieron a estos oligonucleótidos de DNA y crea una imagen que puede indicar una subexpresión o sobreexpresión génica.

Inicialmente se necesitan moléculas de RNAm para poder hacer estudios de expresión génica. Este RNAm se puede extraer prácticamente de cualquier célula, tejido u órgano de una planta o animal, o incluso de una línea celular. Cuando se extrae el RNA, este va en conjunto con todos los RNAs que el organismo sintetiza, por ejemplo, RNAr, RNAt, RNAm, etc. Dicha extracción se puede realizar a través de una gran cantidad de reactivos como trizol que aísla al RNA de tejidos, con trizol-LS si el RNA se tiene que obtener de leucocitos de sangre periférica, o a través de columnas de sílica, etc. Una vez obtenido el RNA total, se debe de sintetizar la primera hebra de cDNA (DNA complementario) a través de oligos dT, y con la ayuda de una enzima denominada transcriptasa reversa (Figura 18). El RNAm tiene una cola de poliA que se va complementar con el oligo dT, posteriormente la transcriptasa reversa va a agregar nucleótidos a la cadena creciente de síntesis. Una vez sintetizada la primera hebra de cDNA se procede a degradar la hebra de RNA, este paso implica la digestión del RNA por medio de una RNasa, posteriormente una DNA polimerasa sintetiza a la segunda hebra de cDNA. Este cDNA de doble cadena sirve entonces para realizar el análisis de expresión génica de un solo gen o de miles de ellos, siempre y cuando los RNAm de interés tengan en su extremo 3' una cola de poliA.

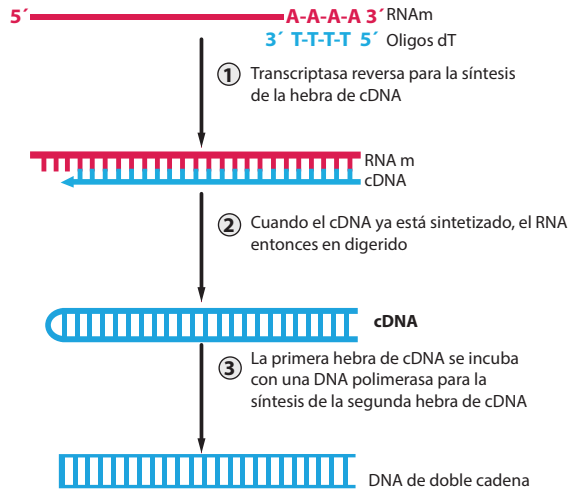


Figura 18. Procedimiento metodológico en la síntesis de DNA complementario (cDNA).

Actualmente, para el análisis de expresión génica global existe una gran cantidad de microarreglos de expresión disponibles en el mercado, sin embargo, las dos compañías más robustas en los análisis de alta densidad son los microarreglos de expresión de Affymetrix e Illumina. Los microarreglos más comúnmente empleados y reportados en artículos científicos para estos análisis son los desarrollados por Affymetrix.

Fundamentos de los microarreglos de expresión

En general, la tecnología de los microarreglos se basa en la hibridación de DNA, cDNA u oligonucleótidos inmovilizados o adheridos a una superficie sólida de vidrio, plástico, etc., en la miniaturización, fluorescencia, lectura de la fluorescencia e interpretación de datos. Hoy en día, diferentes compañías ofrecen una gran variedad de microarreglos de expresión, básicamente los microarreglos se dividen en dos tipos; a) microarreglos de cDNA de diseño compuesto de cDNA u oligonucleótidos y, b) de alta densidad que contienen oligonucleótidos sintetizados por Affymetrix e Illumina. El primero de ellos puede analizar en un mismo arreglo dos muestras diferencialmente marcadas, pero requiere que los genes sean colocados sobre el chip, esto requiere de clones o de miles de secuencias de PCR, a estos microarreglos también se le conoce como

microarreglos punteados (comúnmente se denominan “hechos en casa”). Estos arreglos son vendidos por varias compañías como Qiagen (CA, USA), mediante ellos se interroga de manera sencilla la expresión de genes entre muestras diferencialmente marcadas y que presentan diversos fenotipos o enfermedades. En esta metodología, las sondas son diseñadas por programas bioinformáticos tomando en cuenta la región de interés y aunque estos microarreglos “hechos en casa” son relativamente baratos a gran escala, su principal inconveniente es la gran cantidad de tiempo requerido para optimización de las condiciones, y además, el equipamiento resulta muy costoso.³¹ Otro tipo de microarreglos punteados son los diseñados por Agilent (CA, USA) y Amersham Biosciences (NJ, USA), estos mejoran el análisis de expresión, sin embargo, la relación precio-beneficio resulta aún más costoso. A pesar de estas últimas mejoras, los microarreglos punteados tienen varios inconvenientes como por ejemplo el número de sondas (20,000-50,000) por cada microarreglo, esto debido al propio diseño de la metodología.

Otro tipo de microarreglos que han tenido gran éxito son los diseñados por Affymetrix o Illumina, ambos son de síntesis de oligonucleótidos que son colocados en pozos de superficies sólidas o en perlas, respectivamente. Cada uno de los pozos contiene cientos de miles de secuencias cortas de DNA llamadas sondas, y cada una de ellas tiene una secuencia única de nucleótidos que es complementaria a un sólo gen que se está expresando. Los microarreglos de Affymetrix por ejemplo, no solo identifican la expresión génica sino que además identifican a las diferentes isoformas de diversos RNAm de los genes, este avance ha ampliado drásticamente la identificación de isoformas de los genes que se están expresando en cierta condición o patología.

En general, el RNAm es extraído de una célula/tejido u órgano, a partir de él se sintetiza cDNA en presencia de oligonucleótidos marcados. En el caso de los microarreglos de diseño el RNAm es retrotranscrito en presencia de nucleótidos marcados, usualmente se emplean los fluoróforos Cy3 y Cy5. Esta estrategia permite el análisis de dos colores que identifican a mensajeros de una célula tumoral y una normal en un mismo arreglo. Mientras que para los de alta densidad usualmente se emplea biotina no marcada que interacciona con estreptavidina marcada, así la sonda es fragmentada e hibridada con los oligonucleótidos del microarreglo (Figura 19).³³ Entre las desventajas de este tipo de microarreglos es su elevado costo ya que cada uno de ellos se aplica a un solo experimento.

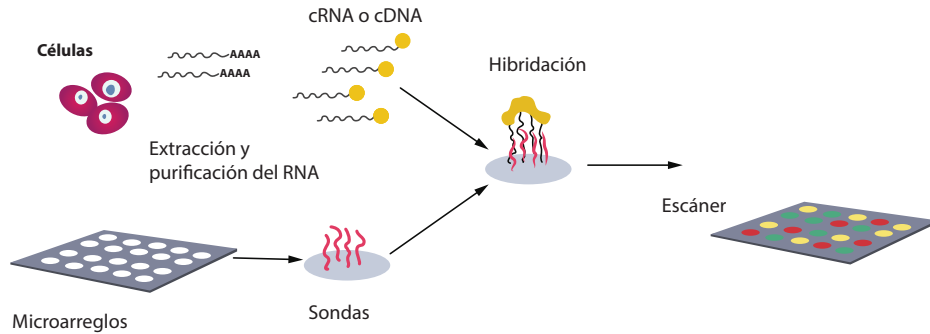


Figura 19. Microarreglos de expresión. En general, en los microarreglos de expresión primero se extrae el RNA de una línea celular, tejido, etc., posteriormente se captura a los RNAm y se sintetiza cDNA o cRNA, estos van a ser marcados con algún fluoróforo, posteriormente, este ácido nucleico va a hibridar con una sonda de DNA contenida en los pozos del arreglo y finalmente estos datos son interpretados por un láser.

Affymetrix

Affymetrix fue una de las grandes compañías impulsora de la tecnología de microarreglos de DNA de alta densidad, su tecnología está basada en la síntesis de oligonucleótidos y no en productos de PCR, ésta característica tiene grandes ventajas, la principal de ellas radica en que no se requieren clonas físicas que representan a los diferentes genes de interés. Esta ventaja se ve reflejada en aquellos genes que tienen una baja expresión o que están restringidos a un tipo celular, ya que pueden sintetizarse sin los problemas que conlleva la generación de productos de PCR a partir de las clonas. Otra ventaja que representa el diseño de oligonucleótidos es su especificidad, con esto es posible distinguir entre la expresión de genes parálogos y evitar una hibridación cruzada entre genes, este punto es uno de los principales problemas que representan los productos generados por PCR.

Desde la incorporación de esta tecnología, Affymetrix ha generado diversos microarreglos. Actualmente, se están empleando los de última generación que implican a un mayor número de sondas y el análisis de un mayor número de genes expresados, entre estos microarreglos se encuentra el Genechip® human exon 1.0 ST y el Genechip® gene 1.0 ST, ambos microarreglos no solo identifican los niveles de expresión de genes que tienen colas de poliA, sino también a las isoformas que se están expresando. Esto es relevante en el campo de la expresión génica y de las enfermedades. Debido a que no todos los RNAm tienen cola de poliA, es posible que estos escapen de los análisis de expresión que dependen

de la cola de poliA, de esta manera, los microarreglos clásicos que incorporan RNAm que tienen en su extremos 3' una cola de poliA no pueden diferenciar a las diversas isoformas generadas por corte y empalme alternativo, evitando así, la identificación de isoformas que juegan un papel fundamental en diversas enfermedades, de hecho, el proceso de corte y empalme es tan importante en la generación de isoformas que más del 60% de los genes lo presentan, incluso hay otros reportes que indican que la mayoría de genes humanos sufren splicing alternativo.³⁴⁻³⁸ De hecho, se ha documentado que aproximadamente el 50% de las enfermedades se deben a mutaciones puntuales que ocurren en estos sitios y aproximadamente el 75% altera secuencias codificantes.³⁹ Así, los microarreglos Genechip® human exon 1.0 ST y el Genechip® gene 1.0 ST producidos por Affymetrix pueden identificar alteraciones en los niveles de expresión y splicing alternativo.

El microarreglo Genechip® human exon 1.0 ST investiga a 1 millón de exones con aproximadamente un set de 1.4 millones de sondas, 4 sondas por exón y 40 por gen. El segundo arreglo interroga a aproximadamente 28, 869 transcritos con 764,885 sondas. Las sondas son contiguas y no se sobrelapan, de hecho, en su diseño se incluyen fragmentos de exones y regiones extremos 3'. El protocolo es muy sencillo y requiere de apenas unos cuantos nanogramos (ng) a 1 microgramo (μg) de RNA (100 ng-1 μg). Brevemente, del RNA total del tejido, célula, etc., a estudiar se limpia del RNAr, se colocan primers T7 (N)⁶ y una secuencia del promotor T7, se sintetizan las dos hebras de cDNA, posteriormente por transcripción *in vitro*, se genera cRNA, entonces se agregan random primer y se vuelve a sintetizar cDNA, entonces el cRNA es digerido, posteriormente hay una fragmentación y marcaje con biotina, finalmente ocurre la hibridación con las sondas del chip, la lectura es analizada y los datos son interpretados.⁴⁰

Illumina

Illumina Inc., es una empresa de recién creación (1998), y la principal competidora de Affymetrix. Similar a Affymetrix, Illumina ha creado diversos microarreglos que analizan de manera global a SNPs localizados a través de todo el genoma, o perfiles de expresión de manera global.⁴¹ La característica de Illumina, es el empleo de perlas contenidas en cada uno de los pozos del microarreglo, cada perla contiene una sonda oligo secuencia específica de 50-meros que va a hibridar con el gen o genes que se están expresando bajo cierta condición. Uno de los microarreglos desarrollados por Illumina, es el Beadchip (HumanHT-12 v4 BeadChip), este microarreglo requiere entre 50 -

100 ng de cRNA e identifica aproximadamente 47,000 transcritos. La tecnología de Illumina está basada similarmente a Affymetrix en la síntesis de cDNA a partir del RNAm, seguida de transcripción *in vitro* para generar cRNA marcado con biotina, posteriormente es hibridado con sondas ubicadas en el arreglo. Brevemente, el RNAm es convertido a una doble hebra de cDNA, seguida por un paso de amplificación (transcripción *in vitro*) para generar cRNA marcado, este se hibrida con una perla que lleva una secuencia de oligonucleótidos específicos, posteriormente un laser detecta la fluorescencia y los datos son interpretados.⁴²

Utilidad de la transcriptómica en enfermedades comunes: Hipertensión arterial, obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y artritis reumatoide

Una de las principales aplicaciones de los microarreglos ha sido en la identificación de genes involucrados con diversas patologías comunes como HTA, obesidad, síndrome metabólico, DMT2, cáncer, enfermedades autoinmunes como LES o AR, entre otras, desde este punto de vista el análisis de expresión del transcriptoma ha sido un parte aguas para la identificación de genes asociados con ciertos padecimientos o características clínicas.

Transcriptómica en hipertensión arterial

Una de las enfermedades más comunes a nivel mundial es la HTA,⁴³ esta patología multifactorial definida como una elevación de la presión arterial sistólica (PAS) igual o mayor a 140 mm de Hg, así como una elevación de la presión arterial diastólica (PAD) igual o mayor de 90 mm de Hg, representa una principal causa de riesgo para ruptura e infarto agudo al miocardio y predispone a los individuos afectados a fallas cardíacas, arritmias ventriculares, fallas renales, ceguera, y otros serios problemas de salud pública. Debido a que ésta enfermedad tiene una etiología multifactorial, es decir, tanto factores genéticos como ambientales juegan un papel fundamental en su desarrollo, en los últimos años se han hecho enormes esfuerzos en la identificación de genes involucrados con HTA; de hecho se ha establecido mediante estudios de heredabilidad que el componente genético excede más del 50% del total de los factores involucrados en su etiología.^{44,45} Recientemente, la identificación de genes involucrados en HTA, PAD o PAS ha dado un salto cuántico debido al uso de microarreglos de SNPs o de expresión.^{46,47} Especialmente, en modelos murinos y por medio de microarreglos de expresión se han descrito una gran cantidad de genes involucrados con HTA.⁴⁸ En humanos, el número de estudios con microarreglos de expresión es reducido, aún así se han identificado algunos

genes involucrados con HTA, que incluyen a reguladores de la presión arterial como el receptor tipo 1 de angiotensina II, endotelina II y III, reguladores de inflamación como quimiocinas, apoptosis como caspasa 2, caspasa 4, caspasa 8, entre otros (Tabla 2).⁴⁹⁻⁵¹ La inflamación en HTA juega un papel muy importante en su fisiopatología, el hecho de encontrar, genes involucrados en la inflamación y apoptosis, etc., no es raro, ya que las células del sistema inmune y desregulación de la apoptosis de estas células son comunes en HTA.

Tabla 2.
Genes representativos que presentan alteración en su expresión en HTA

<i>Genes</i>	<i>Posición</i>	<i>Función</i>	<i>Referencia</i>
NOX1	Xq22	Es una enzima que genera superóxido y regula el	[49]
NOX3	6q25.3	pH celular	
		Es una enzima que genera superóxido y otras	[49]
NOS	17q11.2	especies reactivas de oxígeno	[49]
CAT	11p13	Es una enzima involucrada en neurotransmisión,	[49]
INS	21q22.11	inflamación	[49]
IL4	5q31.1	Enzima antioxidante contra estrés oxidativo	[49]
IL17	22q11	Enzima que convierte el superóxido a oxígeno y	[49]
AGTR1	3q24	agua	[49]
		Citosina que regula negativamente la inflamación	
ECE-1	1p36.1	Citosina involucrada en inflamación y autoinmidad	[49]
CASP2,4 y 8	7q34	Receptor que media el efecto cardiovascular de la	[50]
	11q22	angiotensina II	
FPR3		Enzima involucrada en la activación de la endotelina	
	Xq26	Proteínas que regulan apoptosis	[51]

Involucrada en eventos inflamatorios y apoptosis de neutrófilos

NOX1; NADPH oxidasa 1, *NOX3*; NADPH oxidasa 3, *NOS*; óxido nítrico sintasa, *CAT*; catalasa, *INS*; insulina, *IL4*; interleucina 4, *IL17*; interleucina 17, *AGTR1*; receptor 1 de angiotensina II, *CASP*; caspasa, *FPR3*; receptor peptil formil 3.

Transcriptómica en obesidad

La obesidad representa un serio problema de salud pública a nivel mundial y en México no es la excepción, de hecho en la última década su incidencia sigue aumentando drásticamente.⁵² La obesidad se considera como el principal factor de riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico y diabetes, entre otras.^{53,54} Esta patología comúnmente se clasifica por el índice de masa corporal (IMC; kg/m²), de esta manera se divide en obesidad tipo I (IMC

30-34.99), tipo II (IMC 35-39.99) y obesidad tipo III o mórbida (IMC mayor o igual a 40). Similar a la HTA, la obesidad se comporta como una enfermedad multifactorial, de hecho ha sido estimado en gemelos monocigotos y en familias que el IMC tiene una heredabilidad de hasta el 70%.^{55,56} El número de reportes de análisis de microarreglos de expresión es mayor que en HTA debido a que es más sencillo obtener tejidos humanos con obesidad que con HTA.⁵⁷⁻⁶⁰ A través de estos estudios se ha identificado a una gran cantidad de genes subexpresados o sobreexpresados en diferentes tipos celulares, incluyendo a leucocitos de sangre periférica, tejido adiposo, y que tienen un papel importante en el desarrollo de la obesidad (Tabla 3). Algunos genes que presentan alteraciones en los niveles de expresión participan en las vías de apoptosis, fosforilación oxidativa, inflamación, regulación del ciclo celular, lipólisis, adipogénesis, etc.⁵⁷⁻⁶⁰ Todos estos procesos se han observado que juegan un papel fundamental en la fisiopatología de la obesidad.

Tabla 3.
Genes representativos que presentan alteración en su expresión en obesidad

<i>Genes</i>	<i>Posición</i>	<i>Función</i>	<i>Referencia</i>
CRAT	9q34.1	Enzima que regula el metabolismo mitocondrial, de peroxisomas	[58]
ACC	6q25.3	Enzima involucrada en la síntesis de ácidos grasos	[58]
C/EBP	19q13	Proteína que se une al DNA, regula la expresión de leptina	[58,60]
PPARG	3q25	Receptor que regula la diferenciación de adipocitos	[58,57,60]
MIF	22q11	Citosina que regula inflamación, Quimiocina involucrada en la migración de células inmunes	[58]
CCR2	3p21	Involucrada en inflamación, obesidad, etc.	[58]
TNF- α	6p21	Receptor que regula inflamación, diferenciación, apoptosis.	[57,59]
TNFR	22q11		[57]
TAGLN	11q23	Regula el metabolismo de carbohidratos	[57]
		Involucrado en la homeostasis de la glucosa,	
ANGPTL4	19p13	metabolismo de lípidos	[60]
p21	6p21	Regula apoptosis	[60]
		Efectores de apoptosis	
CASP7	10q25	Receptor que contiene un dominio de muerte que	[59]
FAS	10q24	regula apoptosis	[59]

CRAT; carnitina acetiltransferasa, *ACC*; acetil-CoA carboxilasa 1, *C/EBP*; proteína de unión a enhancer alfa, *PPARG*; receptor de peroxisoma-proliferador activado gama, *MIF*; factor inhibidor de migración de macrófagos, *CCR2*, receptor de quimiocina 2 con motivo C-C, *TNF- α* ; factor de necrosis tumoral alfa, *TAGLN*; transgelina, *ANGPTL4*; proteína 4 parecida angiopoyetina, *P21*; inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1A, *CASP7*; caspasa 7, *FAS*; miembro 6 de la superfamilia de receptores de TNF- α .

Transcriptómica en DMT2

La DMT2 es una enfermedad metabólica que ha emergido en el siglo 21 como una amenaza en salud pública, de hecho se ha estimado que para el 2025 habrá cerca de 300 millones de individuos afectados con esta patología.⁶¹⁻⁶² La DMT2 se caracteriza por su resistencia a la insulina y por una reducida secreción de insulina por las células β pancreáticas.⁶³⁻⁶⁵ Aunque la patofisiología se mantiene en gran medida desconocida, varios factores de riesgo han sido identificados en DMT2, entre estos se incluyen la historia familiar, estilo de vida, ingesta excesiva de alimentos, obesidad, disminución en la actividad física, etc.^{62,63,65}

Los estudios de heredabilidad muestran que en la DMT2 los genes participan en más del 40% en su desarrollo.⁶⁶ Recientemente, el número de artículos científicos que han identificado a genes involucrados con DMT2 se ha incrementado drásticamente. De hecho, diversos estudios de microarreglos de expresión principalmente de Affymetrix han sido reportados, tanto en músculo esquelético, páncreas, tejido adiposo, u otros.⁶⁷⁻⁷³ Entre los genes que se han observado que están afectados sus niveles de expresión se encuentran hormonas sintetizadas en adipocitos, metabolismo de lípidos, gluconeogénesis, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, genes de inflamación, genes del transporte de insulina, entre otros (Tabla 4).⁶⁷⁻⁷³ Algunos genes que presentan alteración en su expresión fueron el del receptor de insulina, protein-fosfatasa 1, lipoprotein-lipasa, factor respirador nuclear 1, coactivador de PPAR γ . Estos genes a nivel fisiológico participan en la regulación del metabolismo de la insulina y otros eventos involucrados directamente en esta enfermedad metabólica.

Tabla 4.
Genes representativos que presentan alteración en su expresión en DMT2

<i>Genes</i>	<i>Posición</i>	<i>Función</i>	<i>Referencia</i>
<i>GLUT4</i>	17p13	Facilita el transporte de glucosa	[67]
<i>IGFBP5</i>	2q33	Involucradas en el crecimiento celular	[67]
<i>SOD2</i>	2q25	Enzima que convierte el superóxido en peróxido	[67]
<i>UCP3</i>	11q13	Protege a la mitocondria de estres producido por lípidos	[67]
<i>NRF1</i>	7q32	Factor de transcripción involucrado con fosforilación oxidativa	[68]
<i>PGC1a</i>	3p21	Coactivador transcripcional involucrado en el metabolismo de energía	[68,69]
<i>TNF-a</i>	6p21	Involucrada en inflamación, obesidad, etc.	[70]
<i>INRS</i>	19p13	Receptor que estimula la ingesta de glucosa	[70,72,73]
<i>IGF2</i>	11p15	Asociado con el metabolismo de lípidos y regulación del peso corporal	[71]
<i>RORC</i>	1q21	Forma un heterodímero con PPARC	[71]
<i>PPP1CB</i>	2p23	Subunidad b de la PPP1 involucrada en metabolismo de glucógeno	[72]
<i>IGF1R</i>	15q26	Receptor 1 del factor de crecimiento parecido a la insulina	[72,73]
<i>PPARG</i>	3p25	Receptor que regula la diferenciación de adipocitos	[73]
<i>IGF2BP2</i>	3q27	Se une al 5' UTR del IGF1R y regula su traducción	[73]
<i>GLUT1</i>	1p34	Facilita el transporta de glucosa	[73]

GLUT4; transportador de glucosa tipo 4, *IGFBP5*; proteína de unión al factor de de crecimiento parecido a la insulina 5, *SOD2*; superóxido dismutasa 2, *UCP3*; proteína desacoplante 3, *NRF1*; factor respiratorio nuclear 1, *PGC1a*; coactivador 1 alfa del receptor de peroxisoma-proliferador activado alfa, *TNF-a*; factor de necrosis tumoral alfa, *INRS*; sustrato del receptor de insulina, *IGF2*; factor de crecimiento 2 parecido a la insulina, *RORC*; receptor nuclear RORC, *PPP1CB*; subunidad catalítica 1 de la proteína-fosfatasa 1, *IGF1R*; receptor 1 del factor de crecimiento parecido a la insulina, *PPARG*; receptor de peroxisoma-proliferador activado gama, *IGF2BP2*; proteína de unión 2 al RNAm del factor de crecimiento 2 parecido a la insulina, *GLUT1*; transportador de glucosa tipo 1.

Transcriptómica en AR

La AR es una enfermedad reumática crónica autoinmune que se caracteriza por presentar dolor, inflamación, y ocasiones graves destrucción de la arquitectura de las articulaciones. A nivel celular y molecular se ha encontrado infiltración y proliferación de diversos tipos celulares del sistema inmune que incluyen macrófagos, linfocitos B y T a la membrana sinovial,^{74,75} estas células liberan diversas proteínas de bajo peso molecular denominadas citosinas y quimiocinas que tienen efectos adversos en la AR.⁷⁶ Esta patología tiene una etiología

multifactorial, y los estudios en gemelos monocigotos y en familias indican que el componente genético alcanza hasta un 60% del total de los factores involucrados en su génesis.⁷⁷ Diversos estudios de análisis del genoma completo y de transcriptoma principalmente con microarreglos de Affymetrix, Illumina, y otros hechos en casa de diversas casas comerciales como Applied Biosystems han identificado a diversos genes involucrados con AR en diversos tipos de muestras que van desde células mononucleares de sangre total, tejido sinovial, etc.⁷⁸⁻⁸⁶ A diferencia de la HTA, obesidad y DMT2, en AR se ha podido evaluar la expresión génica en respuesta a algunos fármacos como infliximab y adalimumab, ambos anticuerpos están dirigidos contra TNF alfa (Tabla 5). Un porcentaje importante de pacientes que responden a esta terapia muestran disminución en la expresión de quimiocinas, las cuales se asociación con inflamación y gravedad en AR. Los genes identificados en AR están involucrados con procesos inflamatorios, quimiotaxis, apoptosis, proliferación, etc (Tabla 6). Algunos genes que presentan alteraciones en los niveles de expresión son *TNF- α* , este gen comúnmente se encuentra sobreexpresado en suero, plasma o líquido sinovial de individuos con AR, de hecho este gen se le considera un marcador de susceptibilidad y gravedad a AR debido a que regula procesos como proliferación, inflamación, apoptosis, diferenciación, destrucción de cartílago y erosión del hueso.^{87,88} Otros genes que se han observado que tienen expresión alterada son CD14, CD163, IL-Ra1, entre otros.⁸³

Tabla 5.
Genes que presentan alteración en su expresión en AR

<i>Genes</i>	<i>Posición</i>	<i>Función</i>	<i>Referencia</i>
CD14	5q31	Involucrado en la activación del sistema inmune a través de lipopolisacáridos de bacterias	[78,79]
DEFA1	8p23	Involucrado en la defensa del huésped	[78]
CD163	12p13	Protege a los tejidos de daño oxidativo	[79]
IL1Ra	2q14	Inhibe la actividad de IL1A	[79]
CCL8	17q115q31	Involucrado en quimiotaxis de monocitos, linfocitos, basófilos	[82]

CD14; molécula CD14, *DEFA 1*; defensina 1, *CD163*; molécula 163, *IL1Ra*, antagonista del receptor de IL1, *CCL8*; ligando 8 de quimiocina con motivo C-C.

Tabla 6. Genes representativos con expresión alterada en AR en respuesta a fármacos

Genes	Posición	Niveles de RNAm después del tratamiento en respondedores	Niveles de expresión después del tratamiento en no respondedores	Función	Referencia
<i>CXCL3</i>	4q21	Disminución		Involucrada en quimiotaxis neutrófilos	[80]
<i>CXCL1</i>	5q31	Disminución		Involucrada en quimiotaxis de monocitos	[80]
<i>CXCL14</i>	4q21	Disminución		Involucrada en quimiotaxis y en angiogénesis	[80]
<i>AKAP9</i>	7q21	Disminución		Involucrada en transducción de señales	[81]
<i>HLA-DPB1</i>	6p21.3	Disminución		Presenta péptidos de proteínas extracelulares	[81]
<i>IL2RB</i>	22q13		Aumento	Regula la inmunidad a través de células T	[83]
<i>CXCL11</i>	4q21		Aumento	Involucrada en quimiotaxis	[84]
<i>IL18</i>	11q22		Aumento	Regula procesos inflamatorios	[84]
<i>IL7R</i>	5p13		Aumento	Regula procesos de recombinación V(D)J en el desarrollo de linfocitos	[84]

CXCL3; ligando 3 de quimiocina con motivo C-X-C, *CXCL1*; ligando 1 de quimiocina con motivo C-X-C, *CXCL14*; ligando 14 de quimiocina con motivo C-X-C, *AKAP9*; proteína asociada a cinasa, *HLA-DPB1*, antígeno leucocitario humano DPB1, *IL2RB*; receptor de IL2 beta, *CXCL11*; ligando 1 de quimiocina con motivo C-X-C, *IL18*; interleucina 18, *IL7R*; receptor de interleucina 7.

Perspectivas

Los estudios de perfiles de expresión del transcriptoma completo mediante microarreglos de expresión, han ayudado a la identificación de genes que presentan expresión alterada bajo cierta condición o enfermedad. A pesar de estos grandes avances en el análisis de miles de genes en un solo experimento o en pocos experimentos, los datos generados deben tomarse con cautela debido en gran parte a la cantidad de los mismos, al bajo número de muestras que se analizan, heterogeneidad clínica, genética, genómica, etc., además, aún debe evaluarse si los genes sobre o sub expresados son causa o efecto de la condición o enfermedad. El hecho de identificar a diversos genes involucrados con la enfermedad, permitirá hacer un diagnóstico más certero y personalizado. Desde el punto de vista de la farmacogenética y farmacogenómica permitirá sintetizar fármacos, sitio dirigido y evitar por ejemplo en AR la sobreexpresión de genes inflamatorios, los involucrados en la destrucción del cartílago y erosión del hueso. Aunque los estudios de expresión del genoma completo han aumentado en los últimos años, es necesario realizar aún muchos más para corroborar los datos hasta hoy encontrados.

Bibliografía

- MCPHERSON JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A, Wallis J, et al. A physical map of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15; 409 (6822): 934-941.
- VENTER JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001 Feb 16; 291 (5507): 1304-1351.
- AUTORES? Finishing the euchromatic sequence of the human genome. International Human Genome Sequencing Consortium. *Nature*. 2004 Oct 21; 431 (7011): 931-945.
- RANA TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jan; 8 (1): 23-36.
- WOODSIDE MT, García-García C, Block SM. Folding and unfolding single RNA molecules under tension. *Curr Opin Chem Biol*. 2008 Dec; 12 (6): 640-648.
- WILUSZ JE, Sunwoo H, Spector DL. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev*. 2009 Jul 1; 23 (13): 1494-1504.
- CHASTAIN M, Tinoco I Jr. Structural elements in RNA. *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol*. 1991; 41: 131-177.
8. Shen LX, Cai Z, Tinoco I Jr. RNA structure at high resolution. *FASEB*. 1995 Aug; 9 (11): 1023-1033.
- ZEMORA G, Waldsich C. RNA folding in living cells. *RNA Biol*. 2010 Nov 1; 7 (6): 8-15.
- KORNBERG RD. The molecular basis of eukaryotic transcription. *Proc Nat Acad Sci. USA*. 2007 Aug 7; 104 (32): 12955-12961.
- BIRNEY E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigó R, Gingeras TR, Margulies EH, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*. 2007 Jun 14; 447 (7146): 799-816.

- HAHN S. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* 2004 May; 11 (5): 394-403.
- JONES KA, Yamamoto KR, Tjian R. Two distinct transcription factors bind to the HSV thymidine kinase promoter in vitro. *Cell*. 1985 Sep; 42 (2): 559-572.
- SANTORO C, Mermod N, Andrews PC, Tjian R. A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs. *Nature*. 1988 Jul 21; 334 (6179): 218-224.
- GIDONI D, Dynan WS, Tjian R. Multiple specific contacts between a mammalian transcription factor and its cognate promoters. *Nature*. 1984 Nov 29-Dec 5; 312 (5993): 409-413.
- PROKUNINA L, Alarcón-Riquelme ME. Regulatory SNPs in complex diseases: their identification and functional validation. *Expert Rev Mol Med*. 2004 Apr 27; 6 (10): 1-15.
- WILL CL, Lührmann R. Spliceosome structure and function. *The RNA world*. Third edition 2006. páginas 369-400.
- RAMÍREZ-BELLO J, Pérez-Méndez O, Ramírez-Fuentes S, Carrillo-Sánchez S, Vargas-Alarcón G, Fragoso JM. Genética y genómica de la hipertensión arterial: una actualización en estudios genómicos. *Arch Cardiol Mex*. In press.
- BURKHARDT R, Kenny EE, Lowe JK, Birkeland A, Josowitz R, Noel M, et al. Common SNPs in HMGCR in micronesians and whites associated with LDL-cholesterol levels affect alternative splicing of exon 13. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Nov; 28 (11): 2078-2084.
- KOMAR AA. SNPs, silent but not invisible. *Science*. 2007 Jan 26; 315 (5811): 466-467.
- SHASTRY BS. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol*. 2009; 578: 3-22.
- HUNT R, Sauna ZE, Ambudkar SV, Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol Biol*. 2009; 578: 23-39.
- KNIGHT JC. Regulatory polymorphisms underlying complex disease traits. *J Mol Med*. 2005 Feb; 83 (2): 97-109.
- FEUK L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 2006 Feb; 7 (2): 85-97.
- RONAGHI M, Langaee T. Single nucleotide polymorphism: discovery, detection and analysis. *Personalized medicine*. 2005; 2 (2): 111-125.

- KNIGHT JC. Functional implications of genetic variation in non-coding DNA for disease susceptibility and gene regulation. *Clin Sci (Lond)* 2003 May; 104 (5): 493-501.
- KNIGHT JC, Udalova I, Hill AV, Greenwood BM, Peshu N, Marsh K, Kwiatkowski D. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet.* 1999 Jun; 22 (2): 145-150.
- MIGNONE F, Gissi C, Liuni S, Pesole G. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.* 2002; 3 (3): review0004.1-0004.10
- CAZZOLA M, Skoda RC. Translational pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease. *Blood.* 2000 Jun 1; 95 (11): 3280-3288.
- LYNCH KW, Weiss A. A CD45 polymorphism associated with multiple sclerosis disrupts an exonic splicing silencer. *J Biol Chem.* 2001 Jun 29; 276 (26): 24341-24347.
- ELVIDGE G. Microarray expression technology: from start to finish. *Pharmacogenomics* 2006 Jan; 7 (1): 123-134.
- VELCULESCU VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science.* 1995 Oct 20; 270 (5235); 484-487.
- KURELLA M, Hsiao LL, Yoshida T, Randall JD, Chow G, Sarang SS, et al. DNA microarray analysis of complex biologic processes. *J Am Soc Nephrol.* 2001 May; 12 (5): 1072-1078.
- LEE C, Roy M. Analysis of alternative splicing with microarrays: successes and challenges. *Genome Biology.* 2004; 5 (7):231-234.
- BEN-DOV C, Hartmann B, Lundgren J, Valcárcel J. Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing. *J Biol Chem.* 2008 Jan 18; 283 (3); 1229-1233.
- JOHNSON JM, Castle J, Garrett-Engle P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD, et al. Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science.* 2003 Dec 19; 302 (5653): 2141-2144.
- International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001 Feb 15; 409 (6822):860-921.
38. Modrek B, Lee CJ. A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet.* 2002 Jan; 30 (1):13-19.
- LOPEZ-BIGAS N, Audit B, Ouzounis C, Parra G, Guigó R. Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? *FEBS Letters.* 2005 Mar 28; 579 (9):1900-1903.

- STEEMERS FJ, Gunderson KL. Illumina Inc. Pharmacogenomics. 2005 Oct; 6 (7): 777-782.
www.Illumina.com
- The World Health Organization. The World Health Report 2002–Reducing Risks, Promoting Healthy Life (World Health Organization, 2002).
- LEVY D, DeStefano AL, Larson MG, O’Donnell CJ, Lifton RP, Gavras H, et al. Evidence for a gene influencing blood pressure on chromosome 17. Genome scan linkage results for longitudinal blood pressure phenotypes in subjects from the framingham heart study. Hypertension 2000 Oct; 36 (4): 477-483.
- RAFIQ S, Anand S, Roberts R. Genome-wide association studies of hypertension: have they been fruitful?. J Cardiovasc Transl Res. 2010 Jun; 3 (3): 189-196.
- NEWTON-CHEH C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L, et al. Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. Nat Genet. 2009 Jun; 41 (6): 666-676.
- LEVY D, Ehret GB, Rice K, Verwoert GC, Launer LJ, deGhghan A, et al. Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. Nat Genet. 2009 Jun; 41 (6): 677-687.
- MARQUES FZ, Campain AE, Yang YH, Morris BJ. Meta-analysis of genome-wide gene expression differences in onset and maintenance phases of genetic hypertension. Hypertension. 2010 Aug; 56 (2): 319-324.
- CHON H, Gaillard CA, van der Meijden BB, Dijkstra HM, Kraaijenhagen RJ, van Leenen D, et al. Broadly altered gene expression in blood leukocytes in essential hypertension is absent during treatment. Hypertension. 2004 May; 43 (5): 947-951.
- TIMOFEEVA AV, Goryunova LE, Khaspekov GL, Kovalevskii DA, Scamrov AV, Bulkina OS, et al. Altered gene expression pattern in peripheral blood leukocytes from patients with arterial hypertension. Ann NY Acad Sci 2006 Dec; 1091: 319-335.
- TIMOFEEVA AV, Goryunova LE, Khaspekov GL, Il’inskaia OP, Sirotkin VN, Andreeva ER et al. Comparative transcriptome analysis of human aorta atherosclerotic lesions and peripheral blood leukocytes from essential hypertension patients. Kardiologiia. 2009; 49 (9): 27-38.
- JAMES WP. The epidemiology of obesity: the size of the problem. J Intern Med. 2008 Apr; 263 (4):336-352.
- REDINGER R. The prevalence and etiology of nongenetic obesity and associated disorders. South Med J. 2008 Apr; 101 (104): 395-399.

- FRAYN KN. Adipose tissue and the insulin resistance syndrome. *Proc Nutr Soc.* 2001 Aug; 60 (3): 375-380.
- PAUZOVA Z, Gossard F, Gaudet D, Tremblay J, Kotchen TA, Cowley AW, et al. Heritability estimates of obesity measures in siblings with and without hypertension. *Hypertension.* 2001 Jul; 38 (1): 41-47.
- WARDLE J, Carnell S, Haworth CM, Plomin R. Evidence for a strong genetic influence on childhood adiposity despite the force of the obesogenic environment. *Am J Clin Nutr* 2008 Feb; 87 (2): 398-404.
- HINDLE AK, Koury J, McCaffrey T, Fu SW, Brody F. Dysregulation of gene expression within the peroxisome proliferation activated receptor pathway in morbidly obese patients. *Surg Endosc* 2009; 23: 1292-1297.
- MACLAREN RE, Cui W, Lu H, Simard S, Cianflone K. Association of adipocyte genes with ASP expression: a microarray analysis of subcutaneous and omental adipose tissue in morbidly obese subjects. *BMC Med Genomics* 2010; 3: 3.
- GHOSH S, Dent R, Harper ME, Gorman SA, Stuart JS, McPherson R. Gene expression profiling in whole blood identifies distinct biological pathways associated with obesity. *BMC Med Genomics* 2010; 3: 56
60. Rodríguez-Acebes S, Palacios N, Botella-Carretero JI, Olea N, Crespo L, Peromingo R, et al. Gene expression profiling of subcutaneous adipose tissue in morbid obesity using a focused microarray: distinct expression of cell-cycle- and differentiation-related genes. *BMC Med Genomics* 2010; 3: 61.
- ZIMMET P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemiology. *Nature* 414; 782-787.
- SIMPSON RW, Shaw JE, Zimmet PZ. The prevention of type 2 diabetes—lifestyle change or pharmacotherapy? A challenge for the 21st century. *Diabetes Res Clin Pract* 2003; 59: 165–180.
- SHULMAN GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106:171–176.
- PEHLING G, Tessari P, Gerich JE, Haymond MW, Service FJ, et al. Abnormal meal carbohydrate disposition in insulin-dependent diabetes. Relative contributions of endogenous glucose production and initial splanchnic uptake and effect of intensive insulin therapy. *J Clin Invest* 1984; 74: 985–991.

- MUOIO DM, Newgard CB. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and [beta]-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 193–205.
- POULSEN P, Kyvik KO, Vaag A, Beck-Nielsen H. Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance—a population-based twin study. *Diabetologia* 1999; 42, 139–145.
- SREEKUMAR R, Halvatsiotis P, Schimke JC, Nair KS. Gene expression profile in skeletal muscle of type 2 diabetes and the effect of insulin treatment. *Diabetes* 2002; 51: 1913-1920.
- PATTI ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: potential role of PGC1 and NFR1. *Proc Nat Acad Sci USA* 2003; 100: 8466-8471.
- MOOTHA VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1 alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 2003; 34: 267-273.
- STENTZ FB, Kitabchi AE. Transcriptome and proteome expressions involved in insulin resistance in muscle and activated T-lymphocytes of patients with type 2 diabetes. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2007; 5: 216-235.
- YANG YL, Xiang RL, Yang C, Liu XJ, Shen WJ, Zuo J, et al. Gene expression profile of human skeletal muscle and adipose tissue of Chinese Han patients with type 2 diabetes mellitus. *Biomed Environ Sci* 2009; 22: 359-368.
- PALSGAAR J, Brøns C, Friedrichsen M, Dominguez H, Jensen M, Storgaard H, et al. Gene expression in skeletal muscle biopsies from people with type 2 diabetes and relatives: differential regulation of insulin signaling pathways. *Plos One* 2009; 4: e6575.
- MARSELLI L, Thorne J, Dahiya S, Sgroi DC, Sharma A, Bonner-Weir S, et al. Gene expression profiles of Beta-cell enriched tissue obtained by laser capture microdissection from subjects with type 2 diabetes. *Plos One* 2010; 5: e11499.
- WEYAND CM, Seyler TM, Goronzy JJ. B cells in rheumatoid synovitis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7 Suppl 3: S9-S12.
- LUNDY SK, Sarkar S, Tesmer LA, Fox DA. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: 202.

- MCINNES IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 429-442.
- MACGREGOR AJ, Snieder H, Rigby AS, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 30-37.
- BOVIN LF, Rieneck K, Workman C, Nielsen H, Sørensen SF, Skjødt H, et al. Blood cell gene expression profiling in rheumatoid arthritis. Discriminative genes and effect of rheumatoid factor. *Immunol Lett* 2004; 93: 217-226.
- BATLIWALLA FM, Baechler EC, Xiao X, Li W, Balasubramanian S, Khalili H, et al. Peripheral blood gene expression profiling in rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2005; 6: 388-397.
- LINDBERG J, af Klint E, Catrina AI, Nilsson P, Klareskog L, Ulfgren AK, et al. Effect of infliximab on mRNA expression profiles in synovial tissue of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R179.
- LEQUERRÉ T, Gauthier-Jauneau AC, Bansard C, Derambure C, Hiron M, Vittecoq O, et al. Gene profiling in white blood cells predicts infliximab responsiveness in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R105.
- GALLIGAN CL, Baig E, Bykerk V, Keystone EC, Fish EN. Distinctive gene expression signatures in rheumatoid arthritis synovial tissue fibroblast cells: correlates with disease activity. *Genes Immun* 2007; 8: 480-491.
- JULIÀ A, Erra A, Palacio C, Tomas C, Sans X, Barceló P, et al. An eight-gene blood expression profile predicts the response to infliximab in rheumatoid arthritis. *Plos One* 2009; 4: e7556.
- BADOT V, Galant C, Nzeusseu Toukap A, Theate I, Maudoux AL, Van den Eynde BJ, et al. Gene expression profiling in the synovium identifies a predictive signature of absence of response to adalimumab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R57.
- CHEN G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002; 296: 1634-1635.
- RAGHAV SK, Gupta B, Agrawal C, Chaturvedi VP, Das HR. Expression of TNF-alpha and related signaling molecules in the peripheral blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients. *Mediators Inflamm* 2006; 2006: 12682.

Proteómica

Verónica Marusa Borgonio Cuadra
Carlos Alfonso Tovilla Zárate

Introducción

Los grandes avances conseguidos en la tecnología del DNA han permitido la secuenciación sistemática de cientos de genomas de diversos organismos, no obstante aun se desconoce la función de la mayoría de las proteínas de los genes detectados, sin dejar de lado que cada gen eucariote puede producir entre tres a seis o más productos proteicos, que en el transcurso de su maduración pueden ser modificados postraduccionalmente y el número de proteínas en un organismo superior puede variar entre 50, 000 y 500, 000 (1,2). Por tal razón es necesario disponer de técnicas que permitan comprender la relación entre la expresión de los genes y su concordancia con los procesos biológicos en los cuales esta involucrado.

Este es precisamente el campo de la proteómica, ciencia dedicada al estudio a gran escala de la expresión de productos génicos presentes en un genoma, célula o tejido mediante métodos bioquímicos con el fin de obtener una visión global e integrada de los procesos celulares. En otras palabras la proteómica es el estudio del proteoma. Mientras que el genoma de un organismo es esencialmente constante a lo largo de la vida, el proteoma tiene un carácter dinámico, la expresión de proteínas cambia en diferentes etapas del ciclo celular pero también en respuesta a acciones externas (2-4). En particular, las diferencias entre un estado "normal" y uno patológico se traducen también a nivel molecular en cambios en los patrones de expresión de proteínas. Por lo tanto el proteoma es sumamente complejo debido a los problemas con los que se enfrenta en cuanto a la abundancia de las proteínas, la dinámica de las proteínas, de su estado de activación y de la interacción de una proteína con otra. Es precisamente esta variabilidad del proteoma lo que lo hace tan atractivo para la investigación biomédica (1,3).

Definición y tipos de proteómica

El término proteoma fue acuñado por Wilkins et al (5) para describir el grupo total de proteínas en una población dada, por ejemplo en células, tejidos, órganos, organismos o estado patológico. Sin embargo proteómica se refiere a un grupo de técnicas perfectamente establecidas y que sirven para identificar proteomas, dichas técnicas además de ser capaces de identificar proteínas sirven para analizar la estructura y función, hoy en día se emplean la técnica de doble híbrido para identificar la interacción proteína-proteína, chips de proteínas basados en anticuerpos y cristalografía para proveer análisis estructural, estas técnicas nos proporcionan una invaluable información acerca del proteoma de una célula, (2, 5-7) pero quizá las técnicas hasta el momento más utilizada se centra en la espectrometría de masas (MS por sus siglas en inglés). Se puede hablar de tres tipos de proteómica, cada uno de los cuales se explicará a continuación.

Proteómica de expresión

Es el estudio cuantitativo de las proteínas expresadas por un organismo en una condición dada, en esta estrategia se compara la expresión del proteoma total entre diferentes muestras, la información obtenida puede permitir la identificación de nuevas proteínas o la identificación de los cambios en el nivel de expresión de proteínas asociados a cambios en las condiciones del organismo (8,9).

Proteómica funcional

Esta rama estudia la identificación de conjuntos funcionales de proteínas, es decir, grupos de proteínas que se localizan en un mismo sitio celular y que operan en mutua interacción (interacciones proteína-proteína, proteína-DNA, proteína-RNA y modificaciones postraduccionales) (8,9).

Proteómica del mapa celular o estructural

La proteómica estructural estudia las proteínas que forman un organelo, o grupo de proteínas que proporcionan información importante sobre señalización, mecanismos de la enfermedad o interacciones proteína-fármacos (8,9). Como

nos podemos dar cuenta, obtener el proteoma de una célula es como tomar una fotografía de todas las proteínas en un momento determinado. Considerando todas las posibilidades se podría decir que un genoma podría dar lugar a un número infinito de proteomas.

Plataforma de las tecnologías proteómicas

En 1950, el investigador sueco E. Edman desarrolló un método que permite saber el orden de los aminoácidos en una proteína, a la que se conoce como degradación de Edman. Durante muchos años esta técnica fue de vital importancia en la investigación bioquímica. La secuenciación parcial de fragmentos proteínicos y el ensamblaje de estas secuencias permitió conocer en forma completa la secuencia de aminoácidos de algunas proteínas. En 1958 F. Sanger obtuvo el Premio Nobel de Química debido a la secuenciación completa de la insulina, proteína involucrada en el metabolismo de la glucosa. Las secuencias parciales obtenidas por Edman también permitieron conocer los extremos amino terminal de muchas proteínas y a, partir de esta secuencia de aminoácidos, construir oligonucleótidos de DNA que, mediante la acción de la DNA polimerasa, permiten el aislamiento del gene que codifica la proteína (2).

Sin embargo, este método de secuenciación no es compatible con los análisis a gran escala que dominan el campo de las ciencias genómicas. Principalmente porque el número de aminoácidos secuenciados es limitado, en general no se excede de 30-40 a-a secuenciados por muestra, es lento (un ciclo/hora), lo que significa que para secuenciar 30 a-a el equipo se demora 30 horas; entonces secuenciar una proteína de 1000 aminoácidos, o secuenciar y conocer el proteoma de una célula resulta realmente impráctico.

Actualmente una clase de técnicas disponible para la separación analítica e identificación de proteínas de mezclas complejas son la electroforesis de primera y segunda dimensión y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en). Son los métodos más comunes de separación, mientras que la MS es la prueba de oro estándar para la identificación de proteínas. (10-14).

Electroforesis de doble dimensión (2D-PAGE)

La electroforesis es un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar bio-moléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa.

Para muchas aplicaciones proteómicas, la electroforesis en una dimensión (1-DE) es el método de elección, las proteínas se separan de acuerdo a su masa y como las proteínas son solubilizadas en dodecil sulfato sódico (SDS), no suele haber problemas de solubilización. Es una técnica sencilla, reproducible y permite la separación de proteínas de 10-300 KDa. Una de las aplicaciones más comunes de la 1-DE es la caracterización de proteínas después de realizar algún tipo de purificación previa. La electroforesis bidimensional 2D-PAGE permite separar hasta miles de proteínas en un solo experimento, y constituye actualmente el método más eficiente para la separación de mezclas muy complejas de proteínas. Está basada en una separación de proteínas en función de la carga, seguida de una separación de las proteínas en función de su masa molecular (11). La separación de la primera dimensión se realiza mediante isoelectroenfoque, durante el cual las proteínas son separadas en un gradiente de pH hasta alcanzar una posición en la que su carga neta es cero, es decir, su punto isoeléctrico. En una segunda dimensión, las proteínas son separadas mediante electroforesis en presencia de SDS. La alta resolución de la técnica consiste en que las dos separaciones se basan en parámetros independientes. La introducción clave para la 2D-PAGE fue el desarrollo de geles con un gradiente de pH inmovilizado (9, 10, 11). El gradiente de pH inmovilizado elimina los problemas de inestabilidad del gradiente y baja capacidad de carga que iban asociados a los gradientes de pH preparados con anfólitos acarreadores. En los geles IPG, el gradiente es generado por las llamadas "inmobilinas" y está copolimerizado con la matriz de acrilamida del gel. Este sistema ha permitido mejorar la resolución y reproducibilidad de los geles así como aumentar la cantidad de proteína que puede ser cargada, la reproducibilidad conseguida con los IPGs ha hecho posible la comparación de mapas entre distintos laboratorios, facilitando así el intercambio de información (11-12).

La aplicación principal de la 2D-PAGE es la proteómica de expresión, con esta técnica la expresión de proteínas de dos muestras se puede comparar de forma cuantitativa, la aparición o desaparición de manchas proporciona información sobre la expresión diferencial de proteínas y la intensidad de las manchas permite conocer los niveles de expresión. Para realizar estos estudios se pueden utilizar organismos completos, líneas celulares o fluidos biológicos. Se pueden comparar tejidos normales con tejidos enfermos, o células tratadas con drogas o diferentes estímulos.

Otra aplicación importante de la proteómica es el mapa celular, donde la 2D-PAGE se utiliza para hacer mapas de proteínas de microorganismos, orgánulos celulares y complejos de proteínas. También se puede utilizar para

caracterizar proteínas en subproteomas que se han obtenido mediante alguna forma de purificación del proteoma (2,8).

La 2D-PAGE también presenta muchas limitaciones. Es una técnica muy laboriosa que requiere bastante tiempo, y difícil de automatizar. La 2D-PAGE está limitada por el número y el tipo de proteínas a resolver. Las proteínas muy grandes o hidrofóbicas no entran en el gel durante la primera dimensión y las proteínas muy ácidas o muy básicas no se resuelven bien. Algunos de estos problemas se pueden resolver mediante fraccionamiento, la utilización de IPGs con diferentes rangos de pH (12).

Otra limitación importante de la 2D-PAGE es la detección de proteínas poco abundantes, algunas de ellas se consideran muy importantes (proteínas regulatorias, proteínas implicadas en la transducción de señales ó receptores). En estos estudios es necesario realizar un fraccionamiento de la muestra para reducir la complejidad de los extractos. Debido a estas limitaciones, la mayor aplicación de esta técnica en el futuro será el análisis y caracterización de subproteomas de complejos proteicos.

Las limitaciones de la 2D-PAGE han impulsado el desarrollo de otras metodologías. Una estrategia desarrollada consiste en digerir con tripsina una mezcla de proteínas para después purificar y analizar los péptidos mediante MS. Los péptidos se pueden purificar mediante cromatografía líquida, electroforesis capilar o mediante una combinación de técnicas como cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de fase reversa. La ventaja de este procedimiento es que se dispone de una gran cantidad de proteínas. Sin embargo, el análisis de los datos requiere una enorme cantidad de tiempo y ordenadores muy potentes. Además se puede perder mucho tiempo y esfuerzo en el análisis de proteínas que no tienen interés.

Espectrometría de masas

A fines de los años ochenta, gracias a la adopción de dos nuevos métodos de ionización de macromoléculas, la MS revolucionó la investigación de proteínas. Los científicos J. Fenn y K. Tanaka desarrollaron los sistemas de ionización de macromoléculas ESI y MALDI, respectivamente, por lo que se los galardonó con el Premio Nobel de Química en el año 2002. El método de ionización por electrodispersión antes mencionado (ESI, del inglés electrospray ionization) permite la ionización de moléculas a partir de una solución acuosa bajo la aplicación de alto voltaje, mientras que la ionización por MALDI (del

inglés matrix laser assisted desorption/ionization) produce iones a través del bombardeo con rayos láser de muestras en estado sólido asistido por matrices cristalizables (1, 7). Estas metodologías solucionaron la dificultad de generar iones a partir de analitos no volátiles, como las proteínas y polímeros. Desde entonces, la MS desplazó a la secuenciación parcial de proteínas por Edman, debido a su sensibilidad (pmol-fmol), exactitud (100-5ppm) y rapidez (minutos-segundos), ésta varía de acuerdo con la complejidad del análisis y el equipo utilizado (12-14). Adicionalmente, la MS se emplea para identificar nucleótidos, carbohidratos, lípidos y polímeros sintéticos.

La MS es una técnica analítica que mide la relación masa/carga de una molécula y se utiliza en la industria farmacéutica desde hace muchos años para la detección e identificación de moléculas pequeñas (menos 1,000 Da). Los equipos que se utilizan para este fin constan de tres componentes fundamentales: la fuente de ionización, el analizador de masas y el detector. De la combinación de estos tres elementos depende la sensibilidad, exactitud y nivel de confianza que se tiene en la identificación de una proteína ejemplo de ellas son los equipos de MALDI-TOF, TOF-TOF o “electrospray” (13,14).

Para realizar un análisis proteómico se consideran aquellas proteínas que hayan resultado de interés luego del análisis por 2-D PAGE, para ello, los péptidos o las proteínas seleccionadas son recuperados desde los geles deshidratados, digeridos enzimáticamente con tripsina y analizados en los MS, los patrones espectrales obtenidos son analizados y comparados con bases de datos y se determinan las características de las proteínas o los péptidos.

Es importante recalcar que el análisis por MS se logró cuando por primera vez se indujo a que las proteínas o los péptidos se ionizaran en el alto vacío por aplicación de un rayo láser que incide en la matriz en la que se depositan las muestras. Los iones producidos viajan a diferente velocidad (dependiendo de su masa) hacia un sistema detector, sitio del espectrómetro de masas en el cual se registran tanto el tiempo de vuelo como la carga de los iones y ello permite generar los patrones espectrales de las proteínas o los péptidos (11,14).

Las bases de datos, disponibles hasta el momento, ya cuentan con los valores obtenidos de MS de muchas proteínas y para algunas de las cuales se conoce perfectamente su composición de aa. Estos datos más las condiciones utilizadas en su análisis por 2-D permiten la identificación de la proteína o a cual pertenece el péptido. La composición de aa exacta de los péptidos o las proteínas, se hace por otro posterior análisis de MS, sólo que en estos, las proteínas son digeridas nuevamente, marcadas en sus regiones carboxilo terminal, separadas por

HPLC y analizadas por EM de ionización de pequeñas alícuotas de los péptidos obtenidos (13). Nuevamente, con la comparación por bioinformática de los resultados obtenidos se logra determinar la composición de aa de los péptidos y su identificación sin necesidad de haber purificado, cristalizado y determinado las propiedades estructurales de las proteínas.

Esta tecnología de MS permite que en un aparato MALDI-TOF o TOF-TOF puedan evaluarse hasta 100 proteínas en un lapso de medio día y en una semana se logren identificar todas las proteínas contenidas en un gel de 2-D. La composición de aa de las proteínas es un proceso más largo y requiere de al menos dos días para el análisis de una mezcla de 3 o 4 proteínas.

Ionización de la muestra para análisis proteómico

Para el análisis de muestras biológicas por MS es necesario que las moléculas estén cargadas eléctricamente y secas. Este requisito se cumple convirtiendo las moléculas en iones desolvatados. Han sido varias las técnicas que se han desarrollado con este fin, las primeras de ellas se basaron en el impacto de electrones y en la ionización química.

Estas técnicas resultaron efectivas para ionizar moléculas pequeñas pero no para la ionización de moléculas de alto peso molecular, como las biomoléculas. Tras estos inconvenientes, la espectrometría de masas se revolucionó en 1981 gracias a la introducción del bombardeo rápido de átomos (FAB, fast atom bombardment) por Barber. Esta técnica posibilitó la ionización y detección de biomoléculas con relativamente buena sensibilidad. Hoy en día, los métodos más comúnmente empleados para generar iones desolvatados son el MALDI y el ESI, estos han reemplazado por completo al FAB, tanto el MALDI como el ESI son métodos de ionización suaves donde se mantiene relativamente la integridad de la muestra (1,9,13).

Método de ionización tipo MALDI

Este método fue introducido en 1988 por Karas y Hillenkamp. En el MALDI la muestra se incorpora en una matriz de moléculas y posteriormente es sometida a radiación con un láser. El láser promueve la formación de iones moleculares, la matriz, capaz de absorber luz de la longitud de onda emitida por el láser, está constituida por una molécula pequeña tal como el ácido 2,5-dihidroxibenzóico, el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico o el ácido sinapínico. Tanto la muestra como

la matriz se colocan en una placa de metal y se dejan evaporar, propiciando la formación de cristales. La placa de metal se coloca en el espectrómetro y el láser es dirigido automáticamente a sitios específicos de la placa. La luz emitida por el láser, generalmente con una longitud de onda de 337 nm, causa la desorción y la ionización de la muestra tanto por protonación como por desprotonación generando iones predominantemente monovalentes. Los iones producidos son posteriormente acelerados hasta el analizador (2, 3,9).

El proceso puede estar automatizado desde la aplicación de la muestra hasta la recolección y el análisis de los datos, lo que constituye la principal ventaja del MALDI. Adicionalmente, no siempre es necesaria que las muestras a analizar sean sometidas a procesos de purificación después de la digestión en gel, lo que constituye otra ventaja de este método sobre el ESI.

Método de ionización tipo ESI (Electrospray Ionization)

En el método ESI, la muestra líquida fluye desde un microcapilar hasta el orificio del espectrómetro de masas, donde una diferencia de potencial entre el microcapilar y la entrada al espectrómetro de masas genera una nube de finas gotas cargadas eléctricamente. Conforme se evapora el solvente, disminuye el tamaño de las gotas mientras que la carga de las mismas permanece constante, dando como resultado iones desolvatados. Las cargas eléctricas se distribuyen estadísticamente en los sitios potenciales de carga de las moléculas de analito, dando como resultado iones multivalentes. A cada ión multivalente se le denomina un estado de carga, y es común obtener una distribución de estados de carga al analizar macromoléculas por ESI. Las proteínas también generan iones multivalentes, sin embargo generalmente la resolución de cada ión multivalente no es suficiente para determinar el número de cargas que posee el ión, con el cual se podría determinar su masa real. Por lo tanto se utilizan las masas de al menos 2 iones multivalentes para calcular la masa real de la proteína mediante algoritmos (2, 9).

La obtención de iones multivalentes es una característica única del método de ESI; esto permite utilizar una menor cantidad de masa del analito, lo que constituye una ventaja para el análisis de macromoléculas (1). La técnica antes mencionada genera flujos que van de 10 a 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Este flujo resulta problemático para el análisis de proteínas, específicamente debido a que la muestra se consume rápidamente y a que el tiempo de análisis es muy corto. Por ello, una mejora importante a este método de ionización ha sido el desarrollo

de la ionización por nanospray, donde se utilizan microcapilares con diámetro interno de 1 a 2 μm y velocidades de flujo de 5 a 10 nL/min. Estos flujos permiten reducir la cantidad de muestra consumida e incrementar el tiempo disponible para el análisis (1, 7).

Existen diversas maneras de hacer llegar la muestra al espectrómetro. La más simple es utilizando micro capilares individuales para cada muestra, de esta manera se evita la contaminación cruzada entre muestras. La purificación de la muestras posterior a la digestión en gel es un requisito para utilizar el método de ESI, y puede llevarse a cabo directamente en los tubos micro capilares. Es debido a este pre-requisito que algunas fuentes de electroespray están conectadas a sistemas de cromatografía que de manera automática purifican y dirigen la muestra al espectrómetro de masas (12,14,15).

Análisis de masa

Después de la conversión de proteínas o péptidos en iones moleculares, estos son acelerados desde la fuente de iones hacia el analizador de masa. En el analizador de masa los iones son separados de acuerdo a su relación carga-masa (m/z) en el vacío.

Analizadores de Cuadrupolo

Uno de los analizadores de masa más comunes es el analizador de cuadrupolo, en él los iones son conducidos a través de un campo eléctrico creado por un arreglo de 4 barras metálicas paralelas, un cuadrupolo puede transmitir todos los iones, o bien actuar como un filtro que permita la transmisión de de iones con una cierta relación m/z . Un solo analizador de cuadrupolo no brinda información útil en análisis de proteómica, sin embargo al combinar tres cuadrupolos en serie y acoplarlos a un sistema de ESI es posible obtener información acerca de la secuencia de amino ácidos de un péptido. Empleando esta configuración, el primer y tercer cuadrupolo actúan como filtros de masa, mientras que el segundo funciona como una celda de colisión en la cual se produce la información sobre la estructura proteica. A esta configuración se le denomina “tandem space” o MS/MS (7, 15).

Aplicaciones de la proteómica

Son muchas las aplicaciones de la proteómica en la biomedicina, se pueden encontrar marcadores proteicos de diferenciación de especies, de desarrollo tisular y celular, de diagnóstico, de seguimiento y del control de terapias farmacológicas, de evaluación de fármacos o de sustancias con potencial farmacológico y de determinación de potencial toxicológico. Las últimas aplicaciones, relacionadas con aspectos farmacológicos, han sido englobadas en lo que se conoce como proteómica funcional, la cual permite varios aspectos: Identificación de moléculas que interaccionan, determinación de sustratos enzimáticos, definición de selectividad de fármacos, localización de proteínas, caracterización de efectos de proteínas expresadas *in vivo*, evaluación de relaciones estructura/función, determinación de modificaciones post-transduccionales inducidas y descubrimiento de nuevos fármacos. Además, se ha considerado que con el empleo de la proteómica en la farmacología se podrán determinar los mecanismos de toxicidad ya que es posible hacer evaluaciones en orina, suero y otros fluidos biológicos (12,16). Esto, también se piensa, tendrá impacto en el aseguramiento de la calidad de nuevos fármacos o de aquellos introducidos recientemente.

En su concepción actual, la proteómica no puede aplicarse de forma efectiva al estudio de componentes de microorganismos o especies de interés en biotecnología o tecnología de alimentos, cuyas proteínas no están suficientemente representadas en las bases de datos.

El desarrollo de nuevos algoritmos informáticos capaces de interpretar de forma inteligente la información generada por la MS permitirá en un futuro próximo aplicar la proteómica al estudio de estas especies. Estos nuevos desarrollos bioinformáticos podrían también aplicarse al estudio sistemático de modificaciones postraduccionales. Estas técnicas, en combinación con los métodos de cromatografía líquida, podrían abrir el camino al estudio de modificaciones postraduccionales a gran escala de forma dinámica, y a la manera como estas modulan, desde una perspectiva global, el control de la inmensa mayoría de los procesos celulares.

Existe un gran número de proteínas y de nuevos genes descubiertos, de los que no se dispone aún de información acerca de su función. Los métodos de predicción de las funciones proteicas constituyen un apoyo teórico importante en el estudio de estas macromoléculas, tanto por la información que proporcionan como por la utilidad que pueden tener en el diseño o de péptidos específicos y

la prospección de nuevas funciones. Estos métodos de predicción de funciones proteicas son probabilísticos, por lo que dependen de la cantidad de datos o la información disponible en un principio; en otras palabras, del tamaño de la muestra por analizar. Por otra parte, el procedimiento que suele utilizarse para realizar predicciones es la comparación con datos de naturaleza semejante. Aquí también es, por tanto, importante el tamaño de la población de referencia, que se trata del volumen de datos con los que se va a comparar la muestra. A este respecto, las poblaciones de referencia son las actuales bases de datos disponibles sobre secuencias moleculares, estructuras secundarias y terciarias, homología total o parcial de genes y proteínas.

Bibliografía

- WALTHER C, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J. Cell Biol.* 2010; 190:491-500.
- PANDO V, Ferreira C. Proteómica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas. *Biotecnología.* 2007; 14: 97-108
- HOCHSTRASSER D, Sanchez J, Appel R. Proteomics and its trends facing nature's complexity. *Proteomics.* 2002; 2: 807-812.
- VERRILS N. Clinical proteomics: Present and future prospects. *Clin Biochem Rev.* 2006; 27: 99-116.
- WILKINS M, Sanchez J, Gooley A, Appel R, Humphery-Smith I, Hochstrasser D, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 1996; 13:19-50.
- APWEILER R, Aslanidis C, Deufel T, Gerstner A, Hansen J, Hochstrasser D, et al. Approaching clinical proteomics: Current state and future fields of application in cellular proteomics. *Cytometry.* 2009; 75:816-832.
- KRUSE U, Bantscheff M, Drewes G, Hopf C. Chemical and Pathway Proteomics. *Moll.Cell.Proteomics.* 2008; 7:1887-1901.
- ANDERSEN J, Mann M. Organellar proteomics: turning inventories into insights. *EMBO.* 2006; 7:874-879.
- IMAI Z, Koshiyama A, Nakata K. Towards clinical proteomics analysis. *Biomed chromatogr.* 2011; 25: 59-64.
- TATE E W. Recent advances in chemical proteomics: exploring the postranslational proteome. *J Chem Biol.* 2008; 1:17-26.
- GRANVOGL B, Plösch M, Eichacker L A. Sample preparation by in-gel digestion for mass spectrometry-based proteomics. *Anal Bioanal Chem.* 2007; 389:991-1002.
- PANDO V, Lanz H, La importancia de la proteómica en la salud pública. *Salud pública de México.* 2009. 51:386-394.

- FENG X, Lui X, Luo Q, Liu Bi-Feng. Mass spectrometry in systems biology: an overview. *Mass Spec Rev.* 2008; 27:635-660.
- AEBERSOLD R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 2003. 422:198-207.
- WERNER T. Proteomics and regulomics: The yin and yang of function a genomics. *Mass Spec Rev.* 2004; 23:25-33.
- Hebestreit H. Proteomics: a holistic analysis of nature´s proteins. *Current opinion in pharmacology.* 2001; 1:513-520.

Mutagénesis

Julia Ruiz Laguna

La mutagénesis es el proceso por el cual ocurren mutaciones. La información genética de un organismo puede ser cambiada de forma estable dando origen a una mutación. Una mutación es cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos del DNA (ácido desoxirribonucleico). Todos los seres vivos sufren sin excepción mutaciones en sus genomas, bien de forma espontánea o como resultado de la exposición a mutágenos. La mutagénesis espontánea se produce endógenamente como consecuencia del metabolismo celular normal como por ejemplo debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) o a hidrólisis espontánea o bien por errores en la replicación o en la reparación. Por su parte, los mutágenos son agentes físicos o químicos que modifican el DNA de un organismo incrementando la frecuencia de mutaciones por encima de su nivel basal. Los mutágenos pueden ser de origen natural o bien antropogénico. Posibles mutágenos para el ser humano son las radiaciones usadas en medicina, industria o en investigación. Además están ciertos aditivos de alimentos, fármacos, plaguicidas, compuestos químicos industriales, etc. Las mutaciones pueden presentarse sobre células somáticas o germinales, en células embrionarias o adultas, en cada caso con consecuencias diferentes. Pueden afectar tanto secuencias que codifican proteínas como secuencias regulatorias o repetitivas. La aparición de mutaciones permite a los individuos adquirir polimorfismos (variabilidad genética) y por consecuencia evolucionar. Se podría decir que la mutagénesis es la fuerza impulsora de la evolución. Sin ellas y la variación genética que generan, los organismos no podrían adaptarse a los cambios del medio ambiente y estarían en riesgo de extinción. Por otro lado, la mayoría de las mutaciones presentan el inconveniente de tener efectos deletéreos o patológicos, siendo fuente de muchos trastornos y enfermedades como el cáncer.

Antecedentes históricos

Hugo de Vries (1901) definió la mutación como cualquier cambio heredable en el material hereditario que no se puede explicar mediante segregación o recombinación.

La mutagenesis como ciencia fue desarrollada a partir de los trabajos de Hermann Muller, Charlotte Auerbach y J. M. Robson en la primera mitad del siglo 20¹

En 1927 Hermann Muller observó por primera vez la inducción de cambios (en concreto mutaciones letales recesivas) en los cromosomas de las moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*) tras la irradiación con rayos X², apoyando la idea de la mutación como la causa del cáncer³. Su contemporáneo Stadler Lewis también mostró el efecto mutacional de los rayos X en la cebada en 1928⁴ y de la radiación ultravioleta (UV) sobre el maíz en 1936⁵. Posteriormente en los años 40, durante la segunda guerra mundial, Charlotte Auerbach y J. M. Robson, encontraron que el gas mostaza también puede causar mutaciones en la mosca de la fruta (por razones obvias los trabajos no se publicaron hasta finalizada la guerra)⁶. El gas mostaza es una agente alquilante bifuncional, con capacidad mutagénica y carcinogénica. Se usó abundantemente durante la primera guerra mundial (1914-1918), en Etiopía y en la guerra Irán-Iraq (1980-1988).

No todos los cambios inducidos en el DNA por mutágenos son fácilmente observables a simple vista siendo más complejo desentrañar su mecanismo de acción. Así, el hollín se sugirió ser causa de cáncer en 1775⁷, y el alquitrán de hulla se demostró que causa cáncer en 1915⁸. Más tarde se encontró que en ambos casos los agentes químicos implicados eran hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)⁹.

A lo largo de los años mediante el uso de diferentes bioensayos se ha demostrado la capacidad genotóxica de numerosos compuestos. En 1973, Ehrenberg introdujo el término genotóxico para referirse a los efectos toxicológicos letales y hereditarios, tanto en las células germinales como somáticas. La ciencia que estudia estos factores así como sus efectos genéticos adversos es la genética toxicológica. Su objetivo es conocer la base molecular de la mutagénesis, es decir, los daños genéticos así como las consecuencias de su expresión. En un principio los mutágenos químicos despertaron interés por su aplicación en las investigaciones genéticas básicas e incluso por su potencial a la hora de introducir variantes genéticas útiles en organismos de interés industrial o agrícola, pero poco después empezó a surgir el lado oscuro de la mutagénesis química.

En efecto, en los años 50 y comienzo de los 60 un grupo de expertos (Muller, Barthelmes, Auerbach, Lederberg, Hollander y otros) pusieron de manifiesto su preocupación por el riesgo que para la salud humana podía representar la exposición a sustancias mutagénicas presentes en nuestro entorno cotidiano. Surgió la llamada mutagénesis ambiental cuyos objetivos eran la identificación de los mutágenos ambientales y la evaluación del riesgo que estos representan para el hombre.

La constatación a lo largo de estos años de la respuesta universal de los organismos, incluidos los mamíferos, a la acción mutagénica de los compuestos químicos, constituyó la base de las 4 recomendaciones formuladas en 1968 en una reunión (Conference on Chemical Mutagens) celebrada en Maine (Bar Harbor):

1. La elaboración de un archivo o registro de compuestos químicos con actividad mutagénica.
2. Los ensayos de mutagenicidad deben formar parte de los ensayos toxicológicos rutinarios, utilizados en la evaluación de compuestos químicos que se usan con fines alimentarios, farmacológicos, o a los que se exponen un gran número de personas por otras razones.
3. Estimular y subvencionar las investigaciones conducentes al desarrollo de métodos sencillos y sensibles para la detección de mutaciones y daños cromosómicos.
4. Explorar la posibilidad de la monitorización genética de poblaciones humanas, con respecto a la inducción de daños cromosómicos y enfermedades genéticas.

Dichas recomendaciones, apoyadas por el poderoso NIH (National Institute of Health) dieron lugar a un desarrollo sin precedentes de nuevas líneas de investigación en el campo de la mutagénesis química, y más específicamente en el campo de la mutagénesis ambiental. Los investigadores en dicho campo empezaron a organizarse en sociedades. Primero surgió la Sociedad Americana de Mutagénesis Ambiental (creada en 1969 por iniciativa del Dr. Hollander) y un año después la europea (fundada a iniciativas del profesor Sobel en Julio de 1970). Actualmente la sociedad europea es una confederación de sociedades nacionales.

En estos últimos años, la relevancia de la mutagénesis ambiental o toxicología genética no sólo no ha disminuido sino que se ha incrementado de forma

espectacular. Hoy día existe el convencimiento de que la sociedad moderna ha creado un nuevo ambiente químico en el cual se encuentra inmerso el ser humano además del resto de los seres vivos.

A esta modificación química de nuestro entorno ha contribuido y contribuye de forma muy importante la actividad industrial. Esta actividad produce una enorme variedad de productos químicos para su consumo directo o para la producción de otros productos más elaborados liberando gran cantidad de residuos y contaminantes industriales. Actualmente la industria fabrica enormes cantidades de fertilizantes, plaguicidas de todo tipo, productos farmacéuticos para uso humano y para la ganadería, productos de cosmética, pinturas, lacas, tintes, etc. Esta actividad industrial consume energía, convirtiendo a la obtención de energía en otra fuente de preocupación, en la que ocupa un papel primordial la generación de electricidad por fisión nuclear.

A esto hay que añadir el hecho de que también se han producido cambios importantes en lo que se denomina el ambiente personal o estilo de vida. Entre los hábitos modernos objeto de preocupación ocupa un papel muy sobresaliente, el consumo de tabaco. La producción masiva de cigarrillos tiene lugar entre mediados del siglo 19 y principios del 20. Aunque el consumo del tabaco parece declinar en las llamadas sociedades del primer mundo, aumenta de forma alarmante en otras partes del mundo.

La idea actual es que debemos proteger el patrimonio genético de la humanidad frente a la agresión desmesurada de mutágenos ambientales. Para ello se deben identificar las sustancias de riesgo y eliminarlas si es posible, o en caso contrario restringir su uso para que el balance riesgos-beneficios sea positivo. Se trata de una tarea difícil, puesto que sólo una minoría de sustancias se ha ensayado en su posible actividad genética, entrando en el comercio cada año unos 500 productos químicos nuevos.

Paralelamente se han identificado números compuestos químicos con capacidad antimutagénica y/o anticarcinogénica. Muchos de ellos son naturales, predominantemente de origen vegetal, pero también pueden ser xenobióticos. Estos compuestos protectores pueden inhibir los procesos mutagénicos y/o carcinogénicos a diferentes niveles de su generación, o bien reparar el daño causado en el DNA.

Mutación

Mutación es toda alteración en la secuencia nucleotídica del material genético. Mutante es toda célula u organismo portador de una mutación. Una posible clasificación de los mutantes es:

- Mutantes morfológicos: aquellos que cambian forma, tamaño, color, etc. Un ejemplo son los albinos (Figura 1).

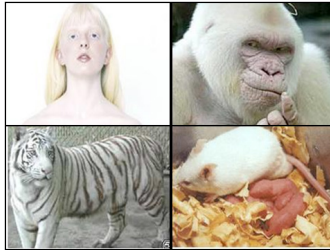


Figura 1. Los albinos son un tipo de mutantes morfológicos.

- Mutantes letales restrictivos: aquellos que albergan una mutación que les produce la muerte.
- Mutantes letales condicionales: aquellos que en condiciones restrictivas mueren pero en condiciones permisivas sobreviven.
- Mutantes bioquímicos: aquellos que tienen alterada algún paso de una ruta bioquímica. Así, una bacteria incapaz de sintetizar un aminoácido dado es auxótrofa para tal aminoácido, siendo protótrofa la bacteria silvestre.

Las mutaciones pueden clasificarse con base en distintos criterios, como son el tipo de célula o el tamaño de la secuencia de DNA afectada.

Clasificación de las mutaciones según el tipo de célula

Los mutantes pueden ser organismos unicelulares o pluricelulares. En el primer caso la mutación sufrida afecta a todo el organismo. Sin embargo, en los organismos pluricelulares la mutación puede ocurrir en células somáticas o bien en células germinales.

Las mutaciones somáticas surgen en los tejidos somáticos, que no producen gametos. Cuando se divide por mitosis una célula somática que tiene una mutación, la mutación se transmite a las células hijas, lo que da lugar a una población de células idénticas desde el punto de vista genético (clon). Cuanto más precoz en el desarrollo se produzca la mutación en una célula somática, mayor será el clon de células en el organismo del individuo que contiene la mutación.

Debido al alto número de células presentes en un organismo eucariote típico, las mutaciones somáticas deben ser numerosas. Por ejemplo, en el cuerpo humano, hay cerca de 10^{14} células. Si sólo surge una mutación por cada millón de divisiones celulares (una tasa de mutación bastante típica), en cada persona deben surgir cientos de millones de mutaciones somáticas. El efecto de estas mutaciones depende de numerosos factores, entre ellos el tipo de célula en la cual ocurren y el estadio de desarrollo en el que surgen. Muchas mutaciones somáticas no tienen un efecto evidente sobre el fenotipo de un organismo, porque la función de la célula mutante se reemplaza por la de una célula normal. Sin embargo, las células con una mutación somática que estimule la división celular pueden aumentar en número y propagarse. Este tipo de mutación puede dar origen a células con una ventaja selectiva y es la base para todos los tipos de cáncer ^{10,11, 12}.

Las mutaciones de la línea germinal surgen en células que finalmente producen gametos. Estas mutaciones pueden transmitirse a generaciones futuras y producir organismos individuales que portan las mutaciones en todas sus células somáticas y en las de la línea germinal. En los organismos diploides sólo las mutaciones dominantes manifiestan su efecto en heterocigosis.

Clasificación de las mutaciones según el tamaño de la secuencia de DNA afectada

Las mutaciones genómicas o cromosómicas numéricas afectan a cromosomas enteros, las cromosómicas estructurales a segmentos cromosómicos que incluyen más de un gen, y las génicas a genes individuales. Esta distinción surgió porque las mutaciones cromosómicas podían observarse directamente, al mirar a los cromosomas con un microscopio, mientras que las mutaciones génicas sólo podían detectarse mediante la observación de sus efectos fenotípicos.

Mutaciones cromosómicas numéricas. Las mutaciones genómicas también reciben el nombre de mutaciones cromosómicas numéricas, pues en ellas

se ve alterado el número de cromosomas de la célula. Dentro de este tipo de mutaciones están las euploidías y las aneuploidías.

La euploidía se da cuando la mutación afecta al número de juegos completos de cromosomas con relación al número normal de cromosomas de la especie. Las euploidías se pueden clasificar por el número de cromosomas que se tengan en:

- Monoploidía o haploidía: Si las células presentan un solo juego (n) de cromosomas.
- Poliploidía: Si presentan más de dos juegos; pudiendo ser: triploides ($3n$), tetraploides ($4n$), etc.

También se pueden clasificar por la procedencia de los cromosomas en:

- Autopoliploidía. Si todos los juegos proceden de la misma especie.
- Aloploidía. Si los juegos proceden de la hibridación de dos especies.

Origen de las euploidías.- Si durante la meiosis se produce en algunas células la no disyunción de todos los cromosomas homólogos se originarán dos gametos con $2n$ cromosomas y dos gametos sin cromosomas (0). La unión de estos gametos entre sí o con gametos n , puede producir cigotos haploides, triploides o tetraploides ($n+0$, $n+2n$, $2n+2n$). En las plantas pueden conseguirse tetraploides, experimentalmente por tratamientos con colchicina.

Efectos fenotípicos de las euploidías.- En general, las anomalías de los euploides son menores que en los aneuploides, en los que los efectos fenotípicos son mayores al no mantenerse equilibradas las dosis relativas de genes¹³.

La aneuploidia se da cuando está afectada sólo una parte del juego cromosómico y el cigoto presenta cromosomas de más o de menos. Los seres humanos tienen una tasa elevada de aneuploidia¹⁴. Las aneuploidías pueden darse tanto en los autosomas (por ejemplo: el Síndrome de Down) (Tabla 1), como en los heterocromosomas o cromosomas sexuales (por ejemplo: el Síndrome de Turner o el Síndrome de Klinefelter) (Tabla 2).

Estas alteraciones se denominan:

- Monosomías: si falta uno de los cromosomas de la pareja de homólogos.
- Trisomías: si se tienen tres cromosomas en lugar de los dos normales.
- Tetrasomías: si se tienen cuatro, pentasomías si tiene 5, etc.

Un ejemplo de trisomía es el Síndrome de Down o trisomía 21¹⁵. Esta trisomía, también conocida como mongolismo es particularmente corriente en la especie humana. Las personas que presentan este síndrome se caracterizan por tener retraso mental, cuerpo corto, dedos cortos y gruesos, lengua hinchada y un pliegue en el párpado parecido al de las razas mongólicas. Parece estar demostrada una cierta relación entre el síndrome de Down y una avanzada edad en la madre. En ciertos casos de mongolismo el individuo presenta una placa metafásica normal con 46 cromosomas, pero uno de los cromosomas del grupo 13-15 es mayor, por lo que se cree que lo que ha sucedido es una translocación de uno de los cromosomas 21 en exceso a uno de los cromosomas del grupo 13-15. Parece ser que las trisomías se originan por una no disyunción de los cromosomas en la primera división de la meiosis.

Importancia evolutiva de las aneuploidías.- Tienen más importancia evolutiva que las anteriores de cara a la obtención de nuevas especies.

Tabla 1.
Ejemplos de aneuploidías en los autosomas de la especie humana

<i>Síndrome</i>	<i>Mutación</i>	<i>Características fenotípicas</i>
Síndrome de Down	Trisomía del par 21	Ojos oblicuos, retraso mental, cabeza ancha y cara redondeada.
Síndrome de Edwards	Trisomía del par 18	Boca y nariz pequeñas, deficiencia mental, lesiones cardíacas, membrana interdigital. Poca viabilidad.
Síndrome de Patau	Trisomía del par 13	Labio leporino, paladar hendido, deficiencias cerebrales y cardiovasculares. Poca viabilidad.

Tabla 2.
Ejemplos de aneuploidías en los cromosomas sexuales de la especie humana

<i>Síndrome</i>	<i>Mutación</i>	<i>Características fenotípicas</i>
Síndrome de Klinefelter	Uno o más cromosomas X en exceso (XXY, XXXY, etc.)	Sexo masculino. Esterilidad, deficiencias mentales y algunos caracteres sexuales secundarios femeninos.
Síndrome de Turner	Monosomía del cromosoma X.	Sexo femenino con un sólo cromosoma X, esterilidad, baja estatura, tórax ancho.
Síndrome de doble Y	Dos cromosomas Y (XYY)	Varones de estatura elevada, se relaciona con una mayor agresividad, bajo coeficiente mental.
Síndrome de triple X	Tres cromosomas X	Sexo femenino. Rasgos físicos similares a otras mujeres de su edad, aunque más altas de lo normal. Problemas de lenguaje. Fértiles.

Mutaciones cromosómicas estructurales. Las mutaciones cromosómicas aparte de numéricas pueden ser estructurales. Se tratan de cambios en la estructura interna de los cromosomas. Se pueden agrupar en dos tipos:

a) Las que suponen pérdida o duplicación de segmentos o partes del cromosoma:

- Deleción cromosómica (Figura 2A) (Figura 3): es la pérdida de un segmento de un cromosoma.
- Duplicación cromosómica (Figura 2B): es la repetición de un segmento del cromosoma.

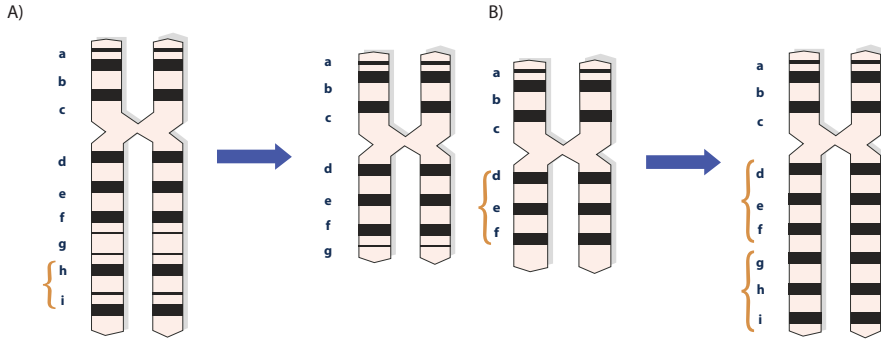


Figura 2. Ejemplo de mutaciones cromosómicas estructurales. A: deleción de un segmento cromosómico (h,i). B: duplicación de un segmento cromosómico (d,e,f).

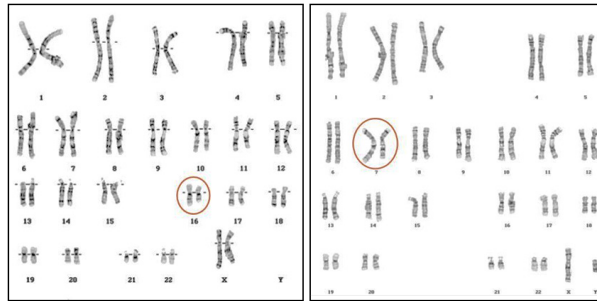


Figura 3. Cariotipos con una deleción en uno de los cromosomas del par 16 (izquierda) o 7 (derecha).

En la especie humana, una deleción particular en el cromosoma 5 provoca el síndrome “cri du chat” (grito de gato) ¹⁶. El nombre alude al tipo de llanto agudo que suena como un gato de los bebés que nacen con esta condición. Otros síntomas comunes de Cri du Chat son bajo peso al nacer, microcefalia con una mandíbula pequeña, retraso mental profundo y detención del crecimiento, fusión de los dedos de manos y pies, ojos muy separados, el desarrollo anormal de habilidad motora, marcas de la piel en la parte delantera de la oreja y una sola línea en la palma de la mano, conocido como un pliegue de simio (Figura 4).

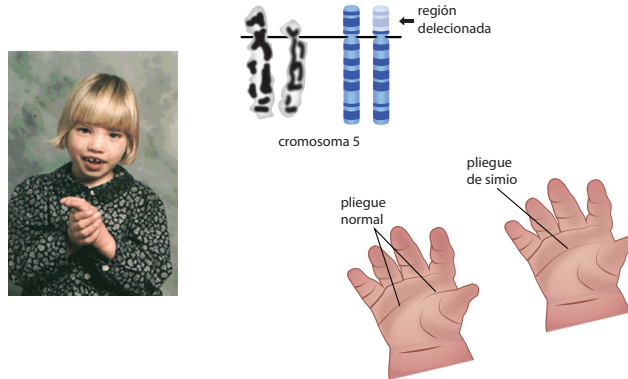


Figura 4. El síndrome “cri du chat” es debido a una deleción particular en el cromosoma 5.

b) Las que suponen variaciones en la distribución de los segmentos de los cromosomas:

- **Traslocaciones (Figura 5A):** un segmento cromosómico de un cromosoma se encuentra situado en otro cromosoma homólogo o no.
- **Inversiones (Figura.5B) (Figura 6):** un segmento cromosómico de un cromosoma se encuentra situado en posición invertida.

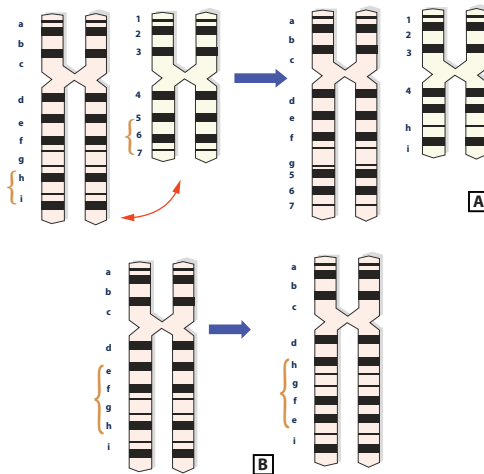


Figura 5. Ejemplo de mutaciones cromosómicas estructurales. A: traslocación de dos segmentos cromosómicos (h,i) y (5,6,7). B: inversión de un segmento cromosómico (e,f,g,h).

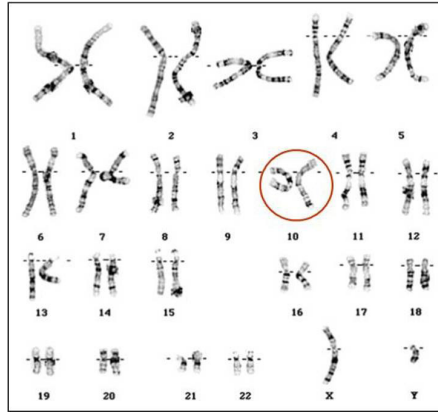


Figura 6. Cariotipos con una inversión en uno de los cromosomas del par 10.

Todos los cambios estructurales que se producen en los cromosomas pueden explicarse por la rotura y reunión de sus fragmentos.

Podemos considerar 3 casos posibles, el primero se refiere a un solo cromosoma y los dos últimos a parejas de cromosomas.

a) Roturas que afectan a un cromosoma:

1er caso.- Si la rotura se produce dentro de un brazo del cromosoma los fragmentos pueden reunirse dando lugar a una deleción o a una inversión más un fragmento sin centrómero (acéntrico) que se pierde.

b) Roturas que afectan a cromosomas distintos:

2º caso.- La rotura afecta a dos cromosomas homólogos simultáneamente. Después de la rotura la reunión de los fragmentos puede producir una duplicación más una deleción.

3er caso.- Afecta a dos cromosomas no homólogos. Después de la rotura se produce un intercambio de fragmentos dando lugar a una translocación entre cromosomas no homólogos: translocación recíproca.

Efecto fenotípico de las mutaciones cromosómicas estructurales: Las deleciones y duplicaciones producen un cambio en la cantidad de genes y por tanto tienen efectos fenotípicos, por lo general deletéreos. Sin embargo las inversiones y

translocaciones no suelen tener efecto fenotípico, pues el individuo tiene los genes correctos, aunque de las translocaciones pueden derivarse problemas de fertilidad por apareamiento defectuoso de los cromosomas durante la gametogénesis o la aparición de descendientes con anomalías. También ciertas translocaciones cromosómicas en humanos se han asociado con ciertos cánceres ^{17, 18, 19}.

Importancia evolutiva de las mutaciones cromosómicas estructurales.- La deleción apenas tiene importancia evolutiva, mientras que la duplicación posee una importancia evolutiva grande. A su vez, las inversiones y translocaciones están también asociadas de una forma importante a la evolución de los seres vivos. Así, por ejemplo, la fusión de dos cromosomas acrocéntricos puede dar lugar a uno metacéntrico, como ha ocurrido con el cromosoma 2 de la especie humana, que es el resultado de la fusión de dos cromosomas de un mono antepasado antropomorfo. Distintos genes de hemofilia se han adquirido también por duplicaciones en el transcurso de la evolución.

Mutaciones génicas. Hay varias formas de clasificar las mutaciones génicas. Algunos esquemas de clasificación se basan en la naturaleza del efecto fenotípico (si la mutación altera por ejemplo la secuencia de aminoácidos de una proteína y, en ese caso, cómo). Otros se basan en el agente causante de la mutación y otros se centran en la naturaleza molecular del defecto.

Dentro de las mutaciones génicas, se dicen puntuales a aquellas que afectan a uno o muy pocos nucleótidos. Atendiendo al cambio producido, estas se denominan sustituciones (cambio de un nucleótido por otro) o desfases (pérdidas –deleciones- o ganancias –inserciones- de nucleótidos).

Sustituciones de bases. Las sustituciones de bases es el tipo más simple de mutación génica, pues consiste en la alteración de un solo nucleótido en el DNA. Debido a la naturaleza complementaria de las dos cadenas del DNA, cuando se altera la base de un nucleótido también se alterará la base del nucleótido correspondiente en la cadena opuesta en la siguiente ronda de replicación.

Las sustituciones provocan la alteración de un único triplete y, por tanto, salvo que indiquen un triplete de parada, o un aminoácido del centro activo de una enzima, no suelen tener grandes efectos sobre la proteína codificada, pues afectan a un único aminoácido y la proteína seguirá pudiendo realizar la misma función. Sin embargo, las mutaciones que impliquen un corrimiento en el orden de lectura, adiciones o deleciones, salvo que se compensen entre sí, pueden alterar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada a partir del punto donde se produjo la mutación y sus consecuencias suelen ser graves,

pues todos los aminoácidos de la secuencia proteica a partir de dicho punto serán diferentes.

Las sustituciones de bases se dicen transiciones cuando una purina se sustituye por otra purina (G por A y A por G) o una pirimidina por otra pirimidina (T por C y C por T). Se llaman transversiones cuando una base púrica se sustituye por una pirimidina (G por T o C y A por T o C), o viceversa (T por G o A y C por G o A) (Figura 7). Existen 12 sustituciones posibles (4 transiciones y 8 transversiones) (Figura 8). Las transiciones son más frecuentes que las transversiones. Cuando 2 mutaciones puntuales afectan a nucleótidos contiguos se denominan mutaciones en tándem.

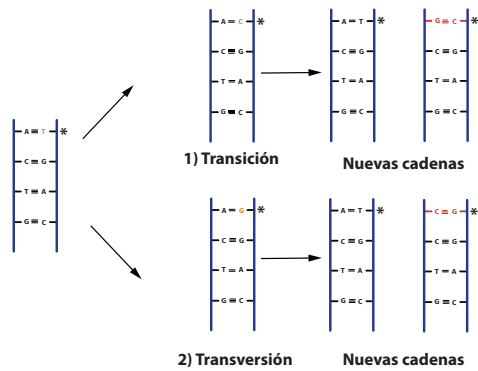


Figura 7. La sustitución de una T por una C provoca una transición $AT \rightarrow GC$. La sustitución de una T por una G provoca una transversión $AT \rightarrow CG$.

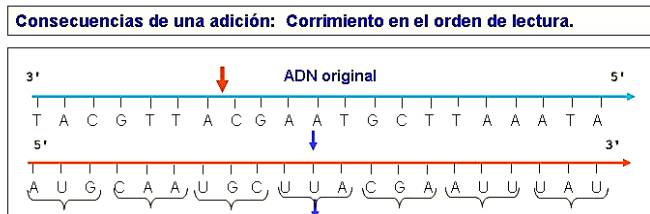


Figura 8. Una transición es la sustitución de una purina por otra purina o de una pirimidina por otra pirimidina; una transversión es la sustitución de una purina por una pirimidina o de una pirimidina por una purina.

Desfases. La segunda clase principal de mutaciones génicas son las inserciones y las deleciones, esto es, la adición o la eliminación, respectivamente, de uno o más pares de nucleótidos. Si bien suele aceptarse que las sustituciones de bases son el tipo más común de mutaciones, el análisis molecular reveló que las inserciones y las deleciones son más frecuentes.

Las deleciones o inserciones (desfases) de uno o dos nucleótidos causan un desfase en la lectura, resultando proteínas no funcionales y por lo general más cortas (Figura 9). Un ejemplo lo encontramos en la hemoglobina Wayne, donde la pérdida de una única base en la secuencia codificante produce un desfase en la lectura y surge una cadena α de la hemoglobina con un mayor número de aminoácidos que la cadena no mutante, dado que la maquinaria de la traducción continúa con la lectura del RNAm mutante hasta que encuentra un nuevo codón de fin de mensaje.

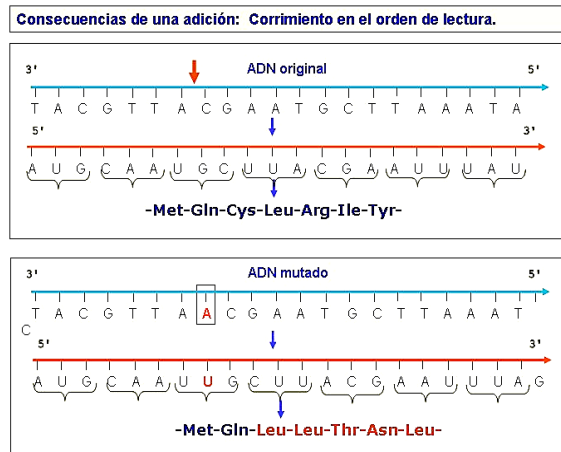


Figura 9. La adición de un nucleótido provoca la alteración del orden de lectura a partir del punto de la inserción.

Efecto fenotípico de las mutaciones. Una mutación que altera el fenotipo silvestre se denomina mutación directa, mientras que una mutación inversa revierte un fenotipo mutante a un fenotipo silvestre.

La sustitución de un nucleótido por otro en la parte codificante de un gen, conlleva la alteración del codón a que dicho nucleótido pertenece. Si el nuevo triplete codifica el mismo aminoácido la mutación se dice silenciosa o con sentido.

Si codifica un aminoácido distinto, la mutación se dice de cambio de sentido o de sentido erróneo (Figura 10).

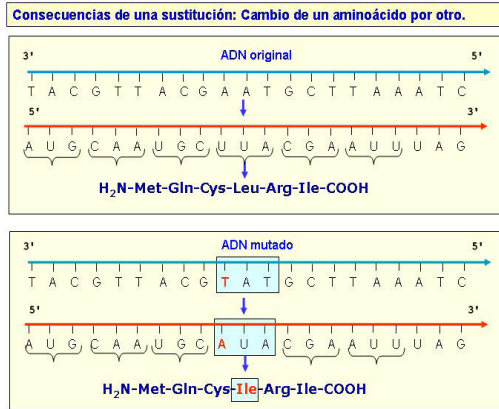


Figura 10. Cuando el triplete afectado por una sustitución codifica un nuevo aminoácido, la mutación se llama de cambio de sentido o de sentido erróneo.

Un caso de este tipo de mutación es la anemia falciforme o drepanocitosis. Se debe a la presencia en las personas que la padecen de una forma de hemoglobina, la hemoglobina S, en la que se ha producido un cambio en el aminoácido 6 de la cadena de hemoglobina β , pasando del aminoácido glutámico a valina. Debido a esto los glóbulos rojos adoptan una forma de hoz cuando disminuye su oxigenación obturando los capilares sanguíneos (Figura 11).

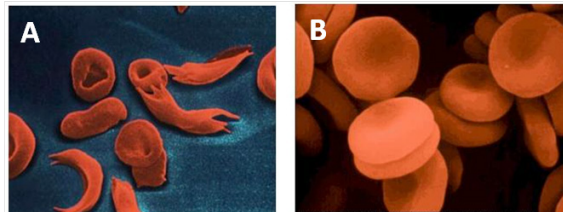


Figura 11. A. Glóbulos rojos de un individuo con anemia falciforme. B. Glóbulos rojos de un individuo normal.

Otro ejemplo de sustituciones de cambio de sentido la encontramos en la hemoglobina constant spring. En la cadena α se produce una transición (T→C) en el primer nucleótido del triplete de fin de mensaje. El fin de mensaje pasa a

ser otro triplete codificante de un aminoácido (gln) de manera que la proteína se hace más larga (de 144 a 173 aminoácidos) hasta que la maquinaria de la traducción encuentra otro fin de mensaje.

Una mutación neutral es una mutación de aminoácido que altera la secuencia de aminoácidos de una proteína, pero que no cambia su función. Se producen mutaciones neutrales cuando se reemplaza un aminoácido por otro químicamente similar o cuando el aminoácido afectado tiene poca influencia en la función de la proteína.

Las mutaciones con pérdida de función producen la ausencia completa o parcial de la función normal. La estructura de la proteína está alterada de tal modo que ya no funciona de manera correcta, o bien la mutación se produce en regiones regulatorias que afectan la transcripción, la traducción o bien al corte y empalme del RNA de la proteína. Las mutaciones con pérdida de función suelen ser recesivas y los individuos diploides deben ser homocigotos para la mutación para que se exhiba el efecto de la pérdida de la proteína funcional.

Las mutaciones con ganancia de función producen un rasgo completamente nuevo o causa la aparición de un rasgo en un tejido inapropiado o en momentos inapropiados durante el desarrollo. Estas mutaciones son a menudo dominantes.

Otros tipos de mutaciones son las mutaciones condicionales que se expresan solo en ciertas condiciones, y las mutaciones letales que causan la muerte prematura.

Si se origina un codón de fin de mensaje, la mutación se denomina sin sentido o de fin de mensaje (Figura 12).

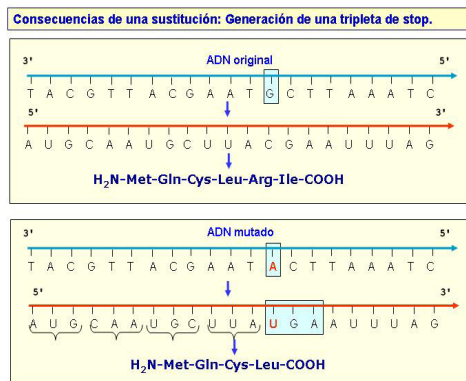


Figura 12. Cuando la sustitución genera un codón de stop, la mutación se dice sin sentido o de fin de mensaje.

Las mutaciones de fin de mensaje suelen ser las de efectos más graves, pues causan con frecuencia la terminación prematura de la síntesis de la proteína mutante. Por el contrario, los mutantes de cambio de sentido expresan por lo general parte de la actividad de la proteína. La redundancia del código genético minimiza las consecuencias deletéreas de las sustituciones de bases. Las mutaciones de fin de mensaje pueden afectar a la expresión de genes distales transcritos en un mismo RNAm. Tales mutaciones se dicen polares. Estas se originan siempre en zonas del DNA organizado en operones, es decir, cuando hay transcripción de varios genes en un único RNAm. La aparición de un fin de mensaje en el primer gen impide la síntesis de las proteínas codificadas en los genes siguientes del operón.

Como ya se ha comentado, las mutaciones puntuales se dicen directas cuando actúan en el sentido silvestre \rightarrow mutante, y reversiones cuando lo hacen en sentido inverso, es decir mutante \rightarrow silvestre. Las mutaciones puntuales pueden revertir. Estrictamente se llama reversión o retromutación a la restauración del cambio original. La reversión así definida es un suceso improbable, tomándose usualmente por reversión el resultado de un proceso distinto llamado supresión. Mediante una segunda mutación, normalmente en una posición distinta a la primera, la supresión no consigue revertir el cambio primitivo pero sí paliar sus efectos. Cuando la segunda mutación supresora afecta al mismo gen se habla de supresión intragénica y si afecta al mismo codón se llama intracodónica. Así, la mutación supresora puede cambiar un segundo nucleótido en el mismo codón alterado por la mutación original y producir un codón que codifica el mismo aminoácido que el codón original no mutado. De esta manera, las sustituciones se corrigen frecuentemente por supresión intracodónica. Las supresiones intercodónicas corrigen por lo general desfases. Si la mutación original es la delección de una base, entonces el agregado de una sola base en cualquier lugar del gen restaurará el marco de lectura anterior a partir de un cierto codón. De forma similar, una mutación por una inserción puede ser suprimida por una delección en el mismo gen. Las supresiones son específicas puesto que las sustituciones suprimen sustituciones y los desfases suprimen desfases.

La compensación estructural de una proteína mutante por supresión intercodónica es también posible pero resulta más improbable. Una primera mutación de cambio de sentido puede alterar el plegamiento de una cadena polipeptídica y cambiar la forma en la que interactúan entre sí los aminoácidos de la proteína. Una segunda mutación de cambio de sentido en un sitio diferente (la supresora) puede recrear el plegamiento original mediante la restauración de las interacciones entre los aminoácidos.

Las supresiones intergénicas normalmente implican a los componentes de la maquinaria de la traducción, como los RNAt, o enzimas como la aminoacilsintetasa o bien la aminoaciltransferasa. Los RNAt supresores son capaces de suprimir desfases, mutaciones de sentido erróneo y mutaciones de fin de mensaje. La mayoría de los RNAt supresores tienen cambiado algún nucleótido de la secuencia del anticodón. Supongamos que la secuencia del DNA original es AAC (UUG en el RNAm) que codifica leucina. Esta secuencia muta a ATC (UAG en el RNAm), un codón de terminación. Esta mutación sin sentido puede suprimirse por una segunda mutación en un gen diferente que codifique una molécula de RNAt de manera que cambie su anticodón siendo ahora capaz de aparearse con el codón de terminación UAG. Por ejemplo, el gen que codifica el RNAt de la tirosina, que tiene el anticodón AUA puede mutar a AUC y por tanto puede aparearse con el codón de terminación UAG. De esta forma en lugar de haber un fin de mensaje se insertará una tirosina en la proteína. El efecto del cambio de leucina por tirosina dependerá del papel que desempeñe la leucina en la estructura global de la proteína, aunque el efecto suele ser menos perjudicial que el de la mutación de fin de mensaje. En *Escherichia coli*, los genes supresores de tripletes de fin de mensaje más eficaces son los supresores de ámbar (UAG) y ópalo (UGA). Los menos eficaces son los de ocre (UAA/G), lo cual tiene su lógica si se tiene en cuenta que normalmente la mayoría de los genes acaban con el triplete UAA.

Las mutaciones supresoras intergénicas también pueden actuar a través de interacciones génicas. Así, 2 cadenas polipepticas codificadas por distintos genes pueden interactuar para producir una proteína funcional. Una mutación en un gen puede alterar el polipéptido de manera que ya no hay interacción y por tanto tampoco proteína funcional. Una mutación supresora en el otro gen puede producir un cambio compensatorio en su polipéptido y restaurar la interacción.

Las compensaciones de índole metabólica se encuentran dentro de las supresiones intergénicas indirectas. Las compensaciones no hereditarias se llaman supresiones fenotípicas. En este caso no es necesaria la producción de una segunda mutación. Una supresión fenotípica es por ejemplo cuando un mutante bacteriano no puede sintetizar un aminoácido. A tal mutante se le puede “suprimir” tal mutación añadiendo al medio de cultivo este aminoácido en cuestión. Por ejemplo, una estirpe Bio⁻ no puede crecer en un medio mínimo, pero si al medio se le suministra biotina sí lo hará, quedando “suprimida” la mutación. En humanos, los diabéticos incapaces de sintetizar insulina, se le “suprime” el efecto de tal mutación suministrándoles dicha hormona.

Expansión por repetición de trinucleótidos

En 1991 se descubrió un nuevo tipo de mutación en el gen FMR-1 que causa el síndrome del X frágil, la causa hereditaria más común de retardo mental^{20,21}. El trastorno se llama así porque en las células de personas con este síndrome, tras un tratamiento especial, el extremo del cromosoma X está unido por un filamento delgado. El gen FMR-1 contiene algunas copias adyacentes del trinucleótido CGG²². El alelo normal tiene 60 copias o menos de este trinucleótido pero en las personas con el síndrome, el alelo puede llevar cientos o hasta miles de copias. La mutación en la cual puede aumentar considerablemente el número de copias de un trinucleótido se denomina expansión por repetición de trinucleótidos.

Se encontró expansión por repetición de trinucleótidos en otras enfermedades raras (Tabla 3).

Tabla 3.

Ejemplos de enfermedades genéticas causadas por expansión por repetición de trinucleótidos

<i>Enfermedad</i>	<i>Secuencia repetida</i>	<i>Nº de copias de la repetición</i>	
		<i>Rango normal</i>	<i>Rango patológico</i>
Atrofia muscular espinal y bulbar	CAG	11-33	40-62
Síndrome del X frágil	CGG	6-54	50-1500
Síndrome de Jacobsen	CGG	11	100-1000
Ataxia espinocerebelosa (varios tipos)	CAG	4-44	21-130
Atasia cerebelosa autosómica dominante	CAG	7-19	37-~220
Distrofia miotónica	CTG	5-37	44-3000
Enfermedad de Huntington	CAG	9-37	37-121
Ataxia de Friedreich	GAA	6-29	200-900
Atrofia dentorrubropalidoluisiana	CAG	7-25	49-75
Epilepsia mioclónica tipo Unverricht-Lundborg*	CCCCGCCCGCG	2-3	12-13

*Técnicamente no es una repetición de un trinucleótido, pero involucra a un múltiplo de tres nucleótidos que se expande y se contrae de forma similar a las repeticiones de trinucleótidos.

El número de copias de repeticiones del trinucleótido suele correlacionarse con la gravedad o la edad de aparición de la enfermedad. También se correlaciona con la inestabilidad de las repeticiones del trinucleótido: cuantas más

repeticiones hay, mayor es la probabilidad de expandir aun más las repeticiones. Esta inestabilidad conduce a un fenómeno conocido como anticipación, en el que las enfermedades causadas por expansión de repeticiones de trinucleótidos se vuelven más graves en cada generación.

Se desconoce cómo un aumento en el número de trinucleótidos produce los síntomas de la enfermedad. En varias de las enfermedades (por ejemplo la enfermedad de Huntington), el trinucleótido CAG (codifica glutamina) se expande dentro de la región codificante de un gen y produce una proteína tóxica que posee residuos de glutamina adicionales. En otras enfermedades (por ejemplo, el síndrome del X frágil y la distrofia miotónica) la repetición está por fuera de la región codificante y por eso debe de existir otro mecanismo de acción. Un tipo raro de epilepsia se ha asociado recientemente con una repetición expandida de una secuencia de 12 pares de bases (pb). Aunque esta repetición no es un trinucleótido se incluye como tipo de expansión de trinucleótido porque su repetición es un múltiplo de tres.

Todavía no está claro el mecanismo que lleva a la expansión de las repeticiones de trinucleótidos. Dos causas posibles son el deslizamiento de las cadenas durante la replicación del DNA y el entrecruzamiento entre las repeticiones mal alineadas. Se sabe que las regiones de cadenas simple de algunas repeticiones de trinucleótidos se pliegan formando horquillas y otras estructuras de DNA especiales. Este tipo de estructuras pueden promover el deslizamiento de las cadenas durante la replicación e impedir que se reconozcan y corrijan estos errores ²³.

Tasas de mutaciones

La frecuencia con la cual un gen cambia del fenotipo silvestre a uno mutante se llama tasa de mutación y suele expresarse como el número de mutaciones por unidad biológica. Por el contrario, la frecuencia de mutación se define como la incidencia de un tipo específico de mutación dentro de un grupo determinado de organismos.

Las tasas de mutaciones están afectadas por tres factores. En primer término, dependen de la frecuencia de cambios en el DNA. Estos cambios pueden ser moleculares espontáneos o bien inducidos por agentes exógenos. Otro factor es la probabilidad de que un daño genético sea reparado. La mayoría de los daños genéticos son reparados antes de la replicación gracias a numerosos mecanismos de reparación de estos daños en el DNA. El tercer factor es la probabilidad de

reconocer una mutación. Así, ciertas mutaciones aparecen con una mayor tasa sólo porque son más fáciles de detectar.

De forma general, las tasas de mutación espontánea son bajas. En bacterias está entre 1×10^{-8} a 1×10^{-10} , mientras que en eucariotes está entre 1×10^{-5} a 1×10^{-10} . Las tasas de mutación varían bastante entre las diferentes especies y dentro de una misma especie hay diferencias entre los genes, quizás debido a que ciertas zonas del DNA son más susceptibles a mutaciones que otras.

Como ya se comentó al principio, la mutación es el motor de la evolución. Así, parece que los ambientes estresantes, donde es necesario adaptarse para sobrevivir, pueden inducir más mutaciones en las bacterias. Se trata de mutaciones adaptativas.

Mecanismos mutagénicos

Las mutaciones son el resultado de cambios naturales en la estructura del DNA (mutaciones espontáneas) o bien de cambios causados por sustancias químicas o radiaciones (mutaciones inducidas).

Mutaciones espontáneas. Cuando Watson y Crick propusieron la estructura de doble hélice para el DNA manifestaron que tal estructura sugería, junto con la replicación semiconservadora, un mecanismo para la producción espontánea de mutaciones: el tautomerismo. Las bases púricas y pirimidínicas existen en diferentes formas químicas denominadas tautómeros. Las dos formas tautoméricas de cada base están en equilibrio pero una forma es más común que la otra. Los apareamientos de adenina con timina y de citosina con guanina ocurren entre las formas comunes, pero si durante la replicación del DNA se encuentran en una forma tautomérica extraña se puede dar lugar a mutaciones como consecuencia de apareamientos erróneos (Figura 13) ²⁴:

A=T → cambio tautomérico de A → A*:T → replicación → A*:C → replicación → G≡C
 C=G → cambio tautomérico de C → C*:G → replicación → C*:A → replicación → T≡A
 T=A → cambio tautomérico de T → T*:A → replicación → T*:G → replicación → C≡G
 G=C → cambio tautomérico de G → G*:C → replicación → G*:T → replicación → A≡T

A=adenina en forma amino (forma común), A*= adenina en imino (forma extraña)
 C=citosina en forma amino (forma común), C*= citosina en forma imino (forma extraña)
 T=timina en forma cetónica (forma común), T*= timina en forma enólica (forma extraña)
 G=guanina en forma cetónica (forma común), G*= guanina en forma enólica (forma extraña)

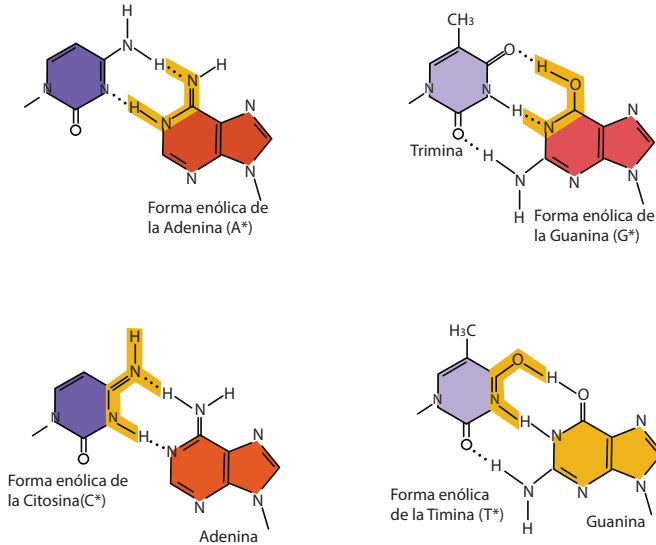


Figura 13. Las formas tautoméricas no comunes inducen mutaciones como consecuencia de apareamientos erróneos.

Otros errores de apareamiento se deben al tambaleo, en el que las bases pueden aparearse erróneamente gracias a la flexibilidad de la doble hélice del DNA. La base apareada de manera incorrecta se denomina error incorporado, el cual tras la replicación dará origen a un error replicado incapaz de ser detectado por ningún mecanismo de reparación ocasionando una mutación permanente.

Inserciones y deleciones pequeñas también se pueden producir de forma espontánea durante la replicación debido al deslizamiento de las cadenas en una zona de bucle. Este tipo de mutaciones también pueden surgir debido a un entrecruzamiento desigual provocado por el erróneo apareamiento de las dos cadenas. Los tramos de secuencias repetidas, como las repeticiones de trinucleótidos o de homopolímeros son más propensas a sufrir estos fenómenos.

Cambios químicos espontáneos. Entre los cambios químicos espontáneos esta la despurinación, esto es la pérdida de una base purínica de un nucleótido al romperse el enlace covalente entre la base con el carbono 1' del azúcar desoxirribosa dando un sitio apurínico (AP). En ausencia de reparación, enfrente del sitio AP se incorpora un nucleótido incorrecto, normalmente la adenina, propiciado por lo general un error replicado en la siguiente ronda. Una célula de mamífero en cultivo pierde cerca de 10000 purinas al día.

Otro cambio químico espontáneo es la desaminación o pérdida de un grupo amino (NH_2) de una base, quedando alteradas sus propiedades de apareamiento. Así, la desaminación de la citosina origina uracilo que si no es eliminado termina apareando en la siguiente ronda con una adenina, dando finalmente una transición $\text{CG} \rightarrow \text{TA}$. La metilación natural de la citosina da origen a la 5-metilcitosina, que al ser desaminada pasa a timina provocando igualmente una transición $\text{CG} \rightarrow \text{TA}$. Sin embargo, este cambio no es detectado por los sistemas de reparación al dar origen a una base normal lo que trae como consecuencia que esta transición sea muy normal en células eucariotas.

Mutaciones inducidas químicamente. Los agentes físicos y químicos capaces de elevar significativamente la tasa de mutación por encima de la tasa espontánea se denominan mutágenos. Hermann Muller demostró que la radiación inducía mutaciones, pero el primer mutágeno químico fue descubierto por Charlotte Auerbach (Figura 14) quien, en colaboración con J. M. Robson, estudió los efectos del gas mostaza sobre *Drosophila melanogaster*.

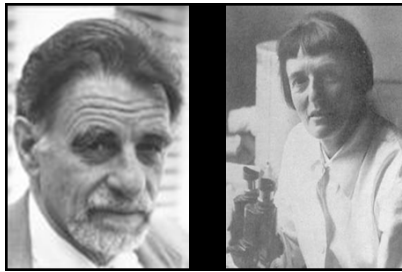


Figura 14. Biólogo estadounidense Hermann Joseph Muller y la alemana Charlotte Auerbach.

Análogos de bases. Se tratan de mutágenos químicos con estructuras similares a las de alguna de las cuatro bases del DNA. La DNA polimerasa es incapaz de distinguir entre las bases y sus análogos de manera que si la replicación tiene lugar en presencia de estos, podrán ser incorporados en la nueva cadena.

El 5-bromouracilo (5BU) es un análogo de la timina. Normalmente se aparea con la adenina pero a veces lo hace con la guanina dando origen a una transición $\text{TA} \rightarrow \text{CG}$ ($\text{T} \cdot \text{A} \rightarrow 5\text{BU} \cdot \text{A} \rightarrow 5\text{BU} \cdot \text{G} \rightarrow \text{C} \cdot \text{G}$) o bien $\text{GC} \rightarrow \text{AT}$ ($\text{G} \cdot \text{C} \rightarrow \text{G} \cdot 5\text{BU} \rightarrow \text{A} \cdot 5\text{BU} \rightarrow \text{AT}$).

La 2-aminopurina (2AP) es un análogo de la adenina. Normalmente se aparea con la timina pero también puede hacerlo de forma incorrecta con la citosina dando una transición $\text{TA} \rightarrow \text{CG}$ ($\text{T} \cdot \text{A} \rightarrow \text{T} \cdot 2\text{AP} \rightarrow \text{C} \cdot 2\text{AP} \rightarrow \text{C} \cdot \text{G}$) o $\text{CG} \rightarrow \text{TA}$ ($\text{C} \cdot \text{G} \rightarrow \text{C} \cdot 2\text{AP} \rightarrow \text{T} \cdot 2\text{AP} \rightarrow \text{T} \cdot \text{A}$).

Agentes alquilantes. Los agentes alquilantes, como por ejemplo el gas mostaza, son sustancias químicas que donan grupos alquilo, como grupos metilo (CH_3) y etilo ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$) a las bases nucleotídicas.

El etilmetanosulfonato (EMS) agrega un grupo etilo a la guanina dando 6-etilguanina. Esta base así modificada se aparea con la timina dando transiciones $\text{CG}\rightarrow\text{TA}$. El EMS también dona un grupo etilo a la timina originando 4-etiltimina, que se aparea con la guanina originando una transición $\text{TA}\rightarrow\text{CG}$ (Figura 15a).

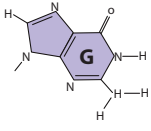
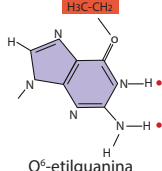
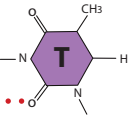
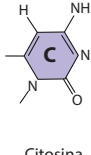
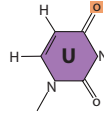
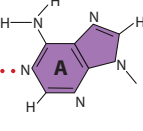
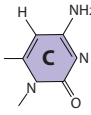
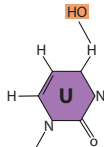
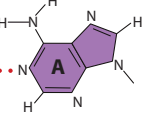
	Base original	Mutágeno	Base modificada	Pareja de apareamiento	Tipo de mutación
(a)	 Guanina	EMS Alquilación	 O ⁶ -etilguanina	 Timina	$\text{CG}\rightarrow\text{TA}$
(b)	 Citosina	Ácido nitroso (HNO_2) Desaminación	 Uracilo	 Adenina	$\text{CG}\rightarrow\text{TA}$
(c)	 Citosina	Hidroxilamina (NH_2OH) Hidroxilación	 Hidroxilaminocitosina	 Adenina	$\text{CG}\rightarrow\text{TA}$

Figura 15. (a) El agente alquilante etilmetanosulfonato (EMS) agrega un grupo etilo a la guanina y produce 6-etilguanina, que se aparea con la timina dando una mutación de transición $\text{CG}\rightarrow\text{TA}$. (b) El ácido nitroso desamina la citosina y produce un uracilo que aparea con la adenina dando una mutación de transición $\text{CG}\rightarrow\text{TA}$. (c) La hidroxilamina convierte la citosina en hidroxilaminocitosina, que suele aparearse con la adenina dando lugar a una mutación de transición $\text{CG}\rightarrow\text{TA}$.

Desaminación. El ácido nitroso desamina la citosina dando un uracilo, quien apareará con la adenina en la siguiente ronda de replicación originando una transición $\text{CG}\rightarrow\text{TA}$ (Figura 15b). Este mutágeno desamina también a la adenina

produciendo hipoxantina. Esta aparece con la citosina y da lugar a una transición TA→CG. El ácido nitroso también transforma a la guanina en xantina quien aparece con la citosina o incorrectamente con la timina generando transiciones CG→TA.

Hidroxilamina. Este mutágeno químico agrega un grupo hidroxilo a la citosina transformándola en hidroxilaminacitosina. Esta base modificada se encuentra con mayor frecuencia en una forma tautomérica extraña que aparece con la adenina dando transiciones CG→TA (Figura 15c).

Reacciones oxidativas. Las especies reactivas de oxígeno (EROs) tales como el radical hidroxilo (OH[•]), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical superóxido (O₂^{•-}), se producen durante el metabolismo aerobio normal pero también como consecuencia de la radiación, el ozono o ciertos compuestos químicos. Entre los generadores artificiales de EROs destacan:

- Metales de transición, en particular hierro y cobre, que pueden actuar como catalizadores en la reducción monoeléctrica del O₂ para generar O₂^{•-}.²⁵
- Compuestos xenobióticos (moléculas quinoides, bifenílos, etc.) que participan en ciclos redox. Estos compuestos se reducen de forma univalente, con consumo de NADPH, en una reacción catalizada enzimáticamente. A continuación se autooxidan con rapidez en presencia de oxígeno, produciendo anión O₂^{•-} y regenerándose la forma oxidada que puede volver a surgir el proceso numerosas veces. El resultado global es un ciclo de oxidación reducción en el que se consume NADPH y se producen grandes cantidades de O₂^{•-}.²⁶
- La oxidación de compuestos fenólicos naturales, ampliamente distribuidos en plantas comestibles, pueden producir grandes cantidades de H₂O₂. A esta producción se liga la actividad mutagénica de bebidas de alto consumo humano, como el té, el café, los vinos y ciertas bebidas destiladas.²⁷
- Miméticos de la reacción de Fenton [Fe(II) + H₂O₂ →OH[•] + OH⁻ + Fe(III)], como la bleomicina, producen O₂^{•-}, H₂O₂ y OH[•] que inician o propagan reacciones en cadena.
- Inhibidores, desacopladores, inductores y seudosustratos que modifican la cadena de transporte electrónico de los citocromos, así como inhibidores de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa (azida, cianuro, aminotriazol, ditiocarbamato, etc.).

Las EROs dañan el DNA y si este no es reparado inducen mutaciones. Así, la oxidación de la guanina origina 8-oxi-7,8-dihidrodesoxiguanina (Figura 16) que suele aparearse de forma incorrecta con la adenina dando transversiones GC→TA.

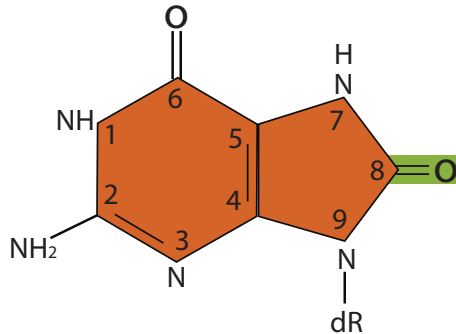


Figura 16. La 8-oxo-hidrodesoxiguanosina (8-oxo-G) es un daño genético ocasionado por EROs.

Agentes intercalantes. Los agentes intercalantes como el SIBR green, bromuro de etidio, la proflavina, la naranja de acridina, ICR-191 y la dioxina son compuestos con estructuras planas que presentan un tamaño similar al de un nucleótido. Se intercalan entre bases adyacentes del DNA distorsionando la estructura tridimensional de la doble hélice ocasionando inserciones y deleciones de un único nucleótido durante la replicación (Figura 17).

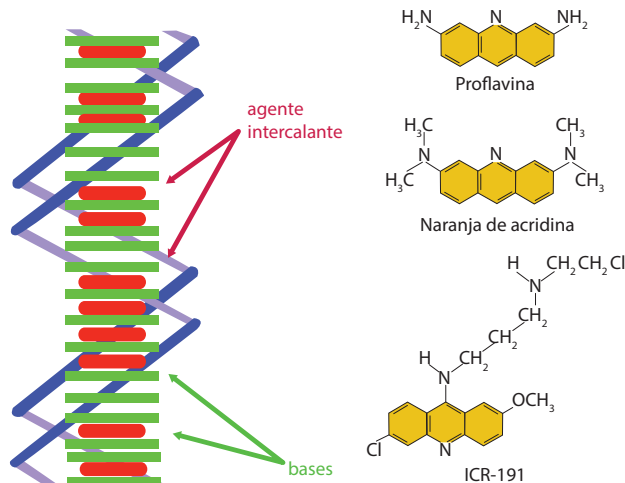


Figura 17. La proflavina, la naranja de acridina y ICR-191 son ejemplos de agentes intercalantes.

Radiación. La alta energía de las radiaciones ionizantes (los rayos X, los rayos gamma, rayos cósmicos) penetra los tejidos y dañan al DNA. Este tipo de radiación transforma las moléculas estables en radicales libres e iones reactivos quienes son capaces de alterar las bases y romper los enlaces fosfodiéster del DNA, así como de producir roturas de la doble cadena del DNA.

La luz ultravioleta (UV) a pesar de no ser una radiación ionizante, es altamente mutagénica. Las bases del DNA absorben la luz UV originando uniones químicas entre las moléculas adyacentes en la misma cadena de DNA o dímeros de pirimidina. Los más frecuentes son los dímeros de timina (Figura 18), aunque también pueden formarse dímeros de citosina y de timina-citosina. Estos dímeros distorsionan la configuración del DNA y con frecuencia bloquean la replicación [28].

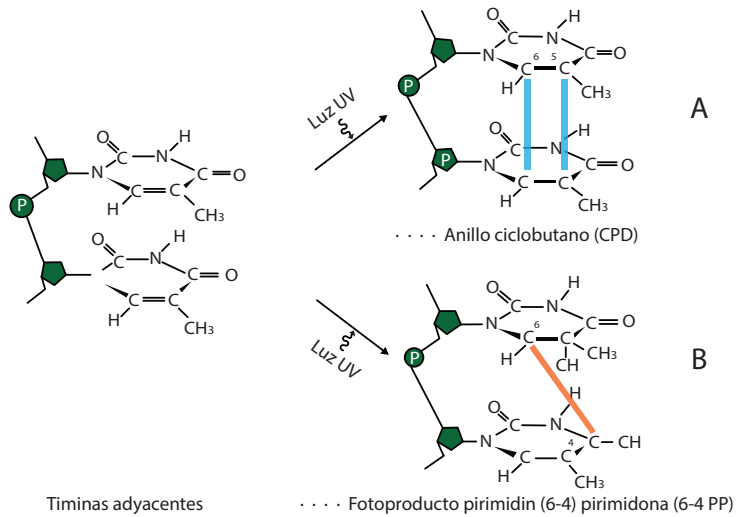


Figura 18. Formación de dímeros de timina inducido por la radiación UV. A: Dímero cissyn ciclobutano (CPD). B: Fotoproducto pirimidin(6-4) pirimidona (6-4PP).

Elementos transponibles [29]. Los elementos transponibles son secuencias de DNA capaces de moverse, que se hallan en los genomas de todos los organismos. En muchos genomas son bastantes abundantes. Por ejemplo, representan al menos el 45% del genoma humano. La mayoría de los elementos transponibles pueden insertarse en muchos sitios diferentes y esto depende de mecanismos distintos de los asociados con la recombinación homóloga. Con frecuencia, estos elementos producen mutaciones, sea por medio de la inserción en otro gen para interrumpirlo, o de la inducción de reordenamientos en la secuencia de DNA, como por ejemplo deleciones, duplicaciones e inversiones.

Hay muchos tipos diferentes de elementos transponibles: algunos tienen estructuras simples y sólo cuentan con las secuencias necesarias para su propia transposición, mientras que otros poseen estructuras complejas y codifican varias funciones que no se relacionan con la transposición de manera directa. A pesar de estas variaciones, muchos elementos transponibles tienen ciertas características en común.

Las repeticiones directas flanqueantes cortas, que miden entre 3 y 12 pb de longitud, se hallan a ambos lados de la mayoría de los elementos transponibles. Estas secuencias no forman parte del elemento transponible y no se mueven con él. En cambio, se producen durante el proceso de transposición en el sitio en el que se inserta el elemento. Las secuencias de estas repeticiones son variables pero su longitud es constante para cada tipo de elemento transponible. La presencia de repeticiones directas flanqueantes indica que cuando el elemento transponible se inserta produce cortes escalonados en el DNA. Dichos cortes escalonados dejan fragmentos cortos de DNA de cadena simple a cada lado del elemento transponible. Luego, la replicación del DNA de cadena simple produce las repeticiones directas flanqueantes (Figura 19).

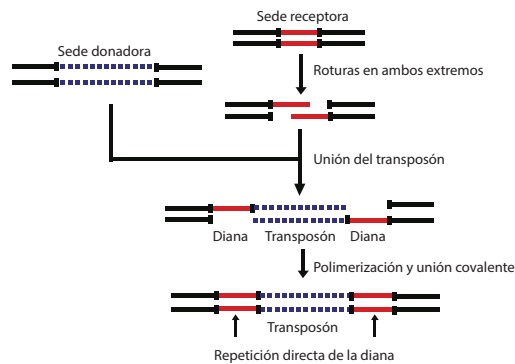
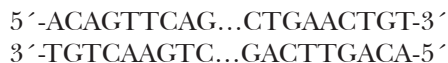


Figura 19. Mecanismo de transposición.

En los extremos de muchos elementos transponibles hay repeticiones terminales invertidas, que son secuencias de entre 9 a 40 pb de longitud y se complementan entre sí de forma invertida, por ejemplo:



En la misma cadena, las dos secuencias no son inversiones simples sino secuencias tanto invertidas como complementarias. Las enzimas que catalizan

la transposición reconocen las repeticiones terminales invertidas necesarias para que se lleve a cabo la transposición.

La transposición es el movimiento de un elemento transponible de un sitio a otro. Este proceso se produce a través de varios mecanismos diferentes que actúan tanto en las células procariontas como en las eucariotas. Sin embargo, todos los tipos de transposición tienen algunas características comunes: 1) en el DNA en el que se produce la inserción se generan cortes escalonados. 2) el elemento transponible se une a los extremos de cadena simple del DNA diana, y 3) El DNA presente en las brechas de DNA simple se replica.

Algunos elementos transponibles se movilizan en forma de DNA (en lugar de transcribirse primero a RNA, como ocurre con los retrotransposones) y se denominan transposones de DNA (también conocidos como elementos transponibles de clase I). Otros elementos transponibles se movilizan en forma de un intermediario de RNA. En este caso, el elemento transponible (DNA) se transcribe a RNA y luego se vuelve a copiar a DNA usando una enzima especial llamada transcriptasa inversa. Los elementos que se transponen a través de un intermediario de RNA se denominan retrotransposones (o transposones de clase II). La mayoría de los elementos transponibles hallados en bacterias son transposones de DNA. En los eucariotes se detectan tanto transposones de DNA como retrotransposones, aunque estos últimos son más frecuentes.

Los transposones de DNA pueden sufrir una transposición replicativa o no replicativa (también llamada conservativa). La primera consiste en la introducción de una copia nueva del elemento transponible en un sitio nuevo mientras que la copia vieja permanece en el sitio original, lo que aumenta el número de copias del elemento transponible. La transposición no replicativa consiste en la escisión del elemento transponible del sitio donde se hallaba y su inserción en un sitio nuevo sin aumentar la cantidad de copias. La transposición no replicativa requiere la replicación de los pocos nucleótidos que constituyen las repeticiones directas (Figura 20). Los retrotransposones emplean sólo la transposición replicativa.

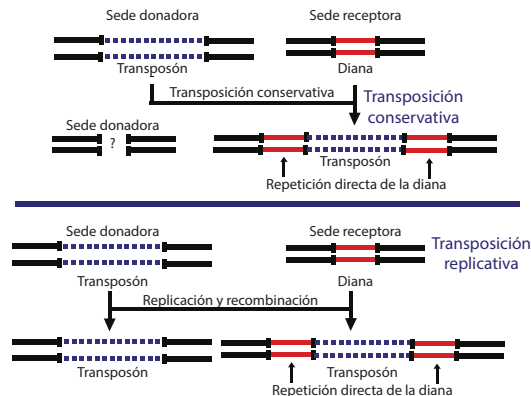


Figura 20. Transposición conservativa (no replicativa) (arriba) y replicativa (abajo)

Efectos mutagénicos de la transposición. Dado que los elementos transponibles pueden insertarse en otros genes y alterar su función, la transposición es en general mutagénica. En realidad, más de la mitad de todas las mutaciones espontáneas que se producen en *Drosophila* se debe a la inserción de un elemento transponible en un gen funcional o cerca de él.

Varios casos de enfermedades genéticas humanas han sido adjudicadas a la inserción de un elemento genético transponible en un gen vital. Aunque la mayor parte de estas mutaciones son nocivas, en ocasiones la transposición puede activar un gen o cambiar el fenotipo de la célula de una manera beneficiosa. Por ejemplo, los elementos transponibles bacterianos pueden ser portadores de genes que codifican resistencia a los antibióticos, y varios elementos transponibles han creado mutaciones que generan resistencia a insecticidas en insectos.

Un ejemplo claro del efecto mutagénico de los elementos transponibles es el color de las uvas, cuyas variedades pueden ser negras, rojas y blancas. Las uvas negras y rojas resultan de la producción de pigmentos rojos (antocianinas) en la piel, los cuales están ausentes en las variedades de uvas blancas. Las uvas blancas resultan de una mutación que ocurrió en las uvas negras que apagó la producción de las antocianinas. Esta mutación consiste en la inserción de un retrotransposón de 10422 pb, llamado *Gret1*, cercano a un gen que promueve la producción de antocianinas. Dicho transposón altera las secuencias que regulan la producción de pigmento. Las uvas rojas resultan de una segunda mutación que ocurrió en las uvas blancas. Esta mutación eliminó casi todo el retrotransposón, lo que nuevamente permitió la producción de pigmento, pero no tan intensamente como en las uvas negras originales.

Como la transposición implica el intercambio de secuencia de DNA y su recombinación, con frecuencia produce reordenamientos del DNA. La recombinación homóloga entre muchas copias de transposones también determina el desarrollo de duplicaciones, deleciones e inversiones. Así, la mutación *Bar* detectada en *Drosophila* es una duplicación en tándem que se cree que proviene de la recombinación homóloga entre dos copias de un elemento transponible en distintas localizaciones del cromosoma X. Algunos elementos transponibles pueden llevar DNA extra cuando se transponen a sitios nuevos. De esta forma, proporcionan el potencial para trasladar secuencias de DNA que regulan los genes a sitios nuevos, donde pueden alterar la expresión génica.

Mutaciones en humanos

La secuenciación rápida y precisa del DNA ha permitido investigar las secuencias de varias mutaciones de genes que afectan a la salud humana. Ejemplo de esto ya se ha visto con anterioridad, con las expansiones de secuencias repetidas de trinucleótidos que son la causa de enfermedades tales como el síndrome de X frágil, la distrofia miotónica o la enfermedad de Huntington.

Los tipos sanguíneos ABO. El sistema ABO se basa en un conjunto de determinantes antigénicos que se encuentran en los eritrocitos y en otras células, especialmente en las de tipo epitelial. La base molecular para estos fenotipos antigénicos es el resultado de mutaciones en el gen que codifica la enzima glucosiltransferasa. Existen tres alelos para este gen, A, B y O. Una determinada sustancia llamada H es modificada en el antígeno A o B, como resultado del producto del alelo I^A o I^B pero no es modificada por el O. Se ha secuenciado el gen de la glucosiltransferasa en 14 personas con diferente condición ABO, encontrándose cuatro sustituciones nucleotídicas en las secuencias de los alelos I^A y I^B, conducentes probablemente a las diferentes modificaciones de la sustancia H. Los individuos homocigotos para el alelo I^O no tienen actividad glucosiltransferasa. Este alelo presenta frente a los otros dos la deleción de un nucleótido al inicio de la secuencia codificante que conlleva la terminación prematura de la cadena polipeptídica.

La distrofia muscular. Esta enfermedad se caracteriza por debilidad y degeneración muscular progresiva. Existen muchos tipos de distrofia que difieren en su inicio, gravedad y causa genética. La distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia muscular de Becker (DMB) son recesivas y ligadas al cromosoma X. La DMD es más grave, con una rápida degeneración muscular que también afecta al corazón y a los pulmones. Los varones afectados pueden morir poco después de los 20 años, mientras que las mujeres no suelen estar afectadas. La DMB por su parte progresa lentamente desde la adolescencia hasta los 50 años o más.

El gen responsable de la DMD y de la DMB, la disfronina, es anormalmente largo, de unos 2,5 millones de pares de bases. En los individuos sanos, la transcripción y el procesamiento posterior del gen producen un RNA mensajero de 14000 bases que se traduce en una proteína de 3685 aminoácidos. Esta proteína se ha detectado en casos leves de DMB pero raramente aparece en el músculo de los enfermos de DMD. Esto hace suponer que la mayoría de las mutaciones que causan DMB no alteran la fase de lectura, mientras que la

mayoría de las mutaciones de la DMD cambian la fase de lectura al principio del gen, causando la terminación prematura de la distrofina. Se ha analizado el gen de 160 afectados de DMD y 34 de DMB. Salvo pocas excepciones, las mutaciones DMD cambian la fase de lectura del gen de la distrofina, mientras que las mutaciones DMB no suelen cambiarla. Aproximadamente dos tercios de las mutaciones que conducen a DMD o a DMB son deleciones o duplicaciones. Sólo un tercio son mutaciones puntuales, y la mayoría de ellas son pequeñas inserciones y deleciones. La mayoría de las mutaciones DMD, tanto las reorganizaciones como las mutaciones puntuales, conducen a la terminación prematura de la traducción. En cambio la mayor parte de las mutaciones DMB alteran la secuencia interna del transcrito pero no alteran la fase de lectura.

Detección de mutaciones

Detección en microorganismos. La detección de mutaciones es más eficiente en microorganismos haploides como bacterias y hongos. A menudo la detección depende de un sistema de selección en el que las células mutantes puedan aislarse fácilmente de las no mutantes.

Neurospora es un moho rosado que suele crecer en el pan y que puede ser cultivado en el laboratorio. Este hongo eucariótico es haploide durante su fase vegetativa de manera que las mutaciones pueden detectarse sin las complicaciones generadas por la heterocigosidad de los organismos diploides. *Neurospora* tipo silvestre crece en medio de cultivo mínimo con glucosa, sales, ácidos inorgánicos, una fuente de nitrógeno y biotina. Los mutantes nutricionales inducidos no crecerán en el medio mínimo necesitando un medio completo o suplementado que contenga numerosos aminoácidos, vitaminas, derivados de los ácidos nucleicos, etc. Una vez se ha detectado y aislado un mutante nutricional, se puede determinar qué sustancia es la que no puede sintetizar cultivando la cepa mutante en una serie de tubos que contengan medio mínimo suplementado con un único compuesto. Beadle y Tatum utilizaron esta técnica de detección durante sus estudios de “un gen: una enzima”³⁰.

Detección en plantas. Los guisantes de Mendel fueron la base de la genética de la transmisión. Estudios posteriores en plantas han incrementado el conocimiento de la interacción génica, de la herencia poligénica, del ligamiento, de las reorganizaciones cromosómicas y de la poliploidía. Muchas de las variaciones se detectan a simple vista, pero también hay técnicas para detectar mutaciones bioquímicas en plantas.

El análisis bioquímico de la cepa mutante de maíz opaque-2 condujo al descubrimiento de su alto contenido en lisina. Este análisis implicó el aislamiento de proteínas del endospermo, su hidrólisis y la determinación de su composición aminoacídica. Dado que el contenido de lisina de las proteínas de maíz es bajo, esta mutación mejora su valor nutricional.

Se han analizado la composición de aminoácidos de diferentes cepas de otras gramíneas como el arroz, trigo, cebada y mijo. Estas investigaciones son útiles para combatir enfermedades de malnutrición como consecuencia de dietas con proteínas inapropiadas o con falta de algún aminoácido esencial.

Otra técnica de detección implica el cultivo tisular de líneas celulares de plantas en medios definidos, pudiéndose determinar la resistencia a herbicidas o a toxinas de enfermedades. Las técnicas asociadas a mutantes letales condicionales pueden usarse en cultivos tisulares y después pueden aplicarse a la genética de plantas superiores.

Detección en la especie humana. Para determinar la base mutacional de cualquier característica o enfermedad humana, los genéticos deben analizar en primer lugar el árbol genealógico de la familia. Si el carácter es hereditario, el árbol genealógico puede servir para determinar si el alelo mutante se comporta como dominante o recesivo, y si está ligado al cromosoma X o es autosómico.

Las mutaciones dominantes son las más sencillas de detectar. Si están en el cromosoma X, los padres afectados pasan la característica fenotípica a todas sus hijas. Si la mutación es autosómica dominante, aproximadamente el 50 por ciento de los descendientes de un individuo heterocigoto afectado mostrarán el carácter.

Las mutaciones recesivas ligadas al cromosoma X también pueden detectarse mediante el análisis de los árboles genealógicos. El caso más famoso de una mutación ligada al cromosoma X en humanos es el de la hemofilia, que se encontró en los descendientes de la Reina Victoria de Inglaterra.

También es posible detectar alelos autosómicos recesivos. Dado en que tal caso el carácter sólo aparece en homocigosis, no es extraño que aparezca de forma intermitente en varias generaciones.

Además del análisis de árboles genealógicos, actualmente las células humanas pueden cultivarse *in vitro* de forma rutinaria. Esto ha permitido detectar muchas más mutaciones que cualquier otra forma de análisis. Técnicas como el análisis de la actividad enzimática, la migración de proteínas en campos electroforéticos, así como la secuenciación del DNA y de las proteínas han permitido identificar mutaciones y demostrar una amplia variación genética entre individuos en

las poblaciones humanas. Así, los estudios iniciales de la enfermedad humana xeroderman pigmentosum se basaron en la técnica de cultivos celulares.

Más recientemente, la genómica y las técnicas de genética reversa han incrementado el número de técnicas disponibles para el estudio de las mutaciones humanas.

Datos relevantes en toxicología genética

Mutaciones germinales en humanos. Por el momento no hay datos suficientes, demostrativos de la inducción de mutaciones germinales en humanos tras la exposición a sustancias mutagénicas. Incluso los estudios genéticos realizados con los descendientes de los sobrevivientes a las explosiones atómicas de Hiroshima y Nagasaki, han resultado negativos en términos generales^{31, 32}. Además, aunque está clara la asociación entre el consumo de tabaco y la aparición de tumores y otros muchos tipos de dolencia, no hay pruebas convincentes de que el consumo de tabaco induzca mutaciones germinales. No obstante, existe un informe sobre el aumento de la tasa de mutación de la línea germinal en las personas expuestas a la radiación en el accidente de Chernobyl³³.

Un problema a considerar es la dificultad para cuantificar mediante estudios epidemiológicos incrementos relativamente pequeños de la tasa de mutación. En la actualidad se están analizando de forma sistemática en distintos países la aparición de características fenotípicas específicas, indicadoras de daños genéticos transmisibles. Son los llamados fenotipos centinelas. Se tratan de fenotipos mutantes fáciles de identificar, indicadores de la inducción de mutaciones germinales dominantes, como la osteogénesis imperfecta (huesos quebradizos) o la acondroplasia (una especie de enanismo), indicadoras de mutaciones génicas, o el síndrome de Down, indicador de una anomalía cromosómica numérica. Cuando el fenotipo mutante dominante surge en ausencia de antecedentes familiares se asume que tienen su origen en la inducción de una nueva mutación germinal. Por ejemplo, desde el punto de vista de los estudios poblacionales es de destacar que la inmensa mayoría de los casos (alrededor del 98%) de Síndrome de Down son atribuibles a sucesos nuevos. Por último hay que resaltar la importancia que para este tipo de estudio puede tener la aplicación sistemática de las nuevas técnicas de biología molecular. Por ejemplo la técnica basada en el análisis de fragmentos de restricción (RFLP) que permite estimar con relativa facilidad la incidencia de la hemoglobina mutante de tipo S (Figura 21).

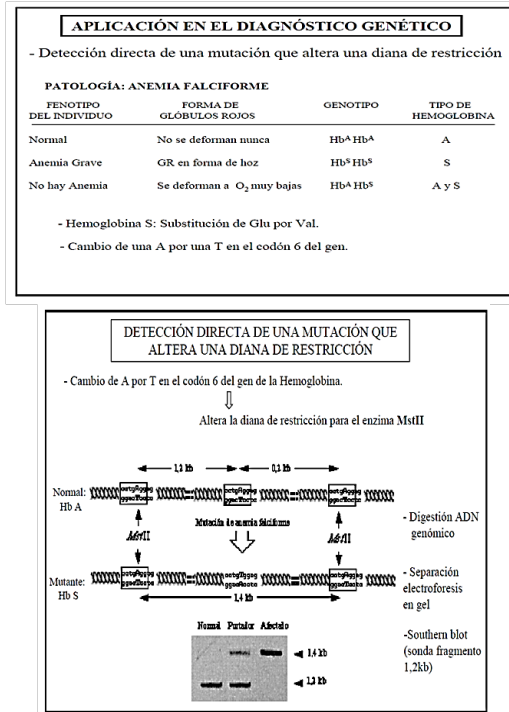


Figura 21. Diagnóstico de la anemia falciforme mediante la detección de una mutación que altera una diana de restricción.

Mutaciones germinales en ratones. En ratones existen datos experimentales suficientes, demostrativos de la inducción de mutaciones germinales por exposición a determinadas sustancias mutagénicas. Uno de los procedimientos más usados ha sido el método denominado SLT (Specific Locus Test). Este método se desarrolló en 1951 en un trabajo sobre la mutagenicidad de los rayos X³⁴. Desde entonces se ha aplicado al estudio de diferentes compuestos químicos.

La principal limitación de los estudios de mutagénesis en la línea germinal estriba en la laboriosidad de los ensayos, que los convierte en estudios lentos y caros que muy pocos laboratorios del mundo son capaces de realizar. Esto explica que sólo entre 20-30 compuestos hayan sido ensayados en su capacidad para inducir mutaciones en la línea germinal de roedores, siendo la mayoría potentes agentes alquilantes. En la actualidad, además, existen muchas restricciones a los ensayos con animales de laboratorio.

Estos ensayos no se conciben en modo alguno como ensayos genotóxicológicos para el escrutinio general de compuestos mutagénicos. Su utilidad se restringe a la demostración de que al menos ciertos mutágenos potentes son capaces de inducir mutaciones transmisibles a la descendencia y al estudio comparativo de la sensibilidad de los diferentes estadios de la espermatogénesis a la acción de los compuestos mutagénicos. Esto último es de gran importancia a la hora de evaluar por extrapolación el posible riesgo genético en humanos.

Si un hombre se expone a una sola dosis de un agente genotóxico que induce mutaciones sólo en espermatozoos y espermátidas, y al poco tiempo de la exposición concibe un hijo. Los espermatozoos disponibles para dicha concepción llevarán todos los cambios mutacionales posibles que podrán ser detectados en la descendencia. Ahora bien, si espera unas cuantas semanas, la probabilidad de detectar una mutación será prácticamente cero.

Por el contrario, si el mutágeno actúa primordialmente en espermatogonia, desde unas cuantas semanas después de la exposición hasta el final de la vida reproductiva del individuo permanecerá el riesgo de la transmisión de mutaciones a la descendencia. Según que compuestos unas etapas son más sensibles que otras.

Otra posible utilidad de este tipo de ensayos sería la detección de mutágenos específicos de la línea germinal. Desde un punto de vista teórico esto no es posible, dado por ejemplo las peculiaridades del proceso meiótico, ausente en las células somáticas. Hasta hoy no se ha descubierto ningún mutágeno específico de la línea germinal, por lo que los ensayos basados en la detección de mutaciones germinales carecen por el momento de valor como ensayos de identificación de sustancias mutagénicas, restringiéndose su interés a la evaluación del riesgo genético en el sentido discutido anteriormente.

Mutaciones somáticas (estudios *in vivo*). Las mutaciones somáticas son relevantes desde el punto de vista de la inducción de tumores, dado que son la base y origen del cáncer. Cuando la cuestión que se plantea es la inducción de mutaciones somáticas en lugar de la inducción de mutaciones en la línea germinal la cosa se simplifica enormemente, ya que las consecuencias de la mutación se analizan en el propio individuo tratado en lugar de en su descendencia. Tradicionalmente, los genes diana en este tipo de estudio son aquellos cuya inactivación por mutación confiere un fenotipo celular seleccionable. Por ejemplo, las mutaciones en el gen que codifica la enzima hypoxantina-guanina fosforribosil transferasa confieren resistencia a un tóxico: la tioguanina. La principal limitación de este tipo de

estudio es su restricción a aquellos tejidos celulares susceptibles de proliferación *in vitro* (donde se seleccionaran las mutaciones) que expresen además el gen que actúa como blanco de las mutaciones. Esta limitación restringe la detección de mutaciones a unos pocos tipos celulares.

Debido a la mayor simplicidad a la hora de la detección de mutaciones somáticas frente a las germinales, no existe el problema de escasez de datos demostrativos de la inducción de mutaciones somáticas en humanos tras la exposición a sustancias mutagénicas. No obstante, el hecho de que el problema sea menos complejo no significa necesariamente que sea sencillo. De hecho, la biomonitorización de poblaciones humanas presenta hoy en día numerosos problemas técnicos y de interpretación que explica por qué los datos sin ser inexistentes son muy escasos.

Uno de los problemas más difíciles de solucionar cuando se estudian poblaciones humanas es conseguir poblaciones que hayan sido expuestas a un solo mutágeno. Este problema es obviamente fácil de solucionar cuando se trabaja con animales de experimentación, ya que en estos casos la exposición al mutágeno la controla el propio experimentador. El volumen de datos existentes sobre la inducción de mutaciones somáticas en animales de experimentación, es por esta y otras razones técnicas, muy superior al existente en humanos.

No obstante, merece la pena mencionar que el progreso de los estudios de mutagénesis, como ocurre con otros estudios, ha seguido históricamente una trayectoria más o menos errática, al verse fuertemente influenciado por los avances técnicos del momento.

A este respecto sólo mencionar las expectativas que despertaron los llamados animales transgénicos. Los animales transgénicos son animales en los que se ha insertado experimentalmente en su genomio un determinado trozo de DNA. En los estudios de mutagénesis se trata de la secuencia diana de los mutágenos. Esta secuencia se hace acompañar de otras cuya misión es facilitar la recuperación del DNA integrado para el posterior análisis molecular de las mutaciones inducidas.

Así, la secuencia diana se puede combinar con distintas secuencias promotoras específicas de diferentes tejidos, ampliándose de este modo el número de tipos celulares en los que la mutagénesis puede ser estudiada, sin tener que variar el blanco genético. También la secuencia diana se puede combinar con características topológicas específicas del genomio de mamíferos, por ejemplo, secuencias de DNA altamente repetidas, para analizar su influencia en la inducción de mutaciones. Finalmente, otra gran ventaja de los animales transgénicos es la posibilidad de comparar la tasa de mutación y cáncer, del

mismo tejido, de la misma especie de animal transgénico. Tal comparación contribuye de forma importante a la comprensión del papel de la mutagénesis en la carcinogénesis.

La detección de mutaciones somáticas no sólo es relevante por la dificultad de la detección de mutaciones en la línea germinal, sino por su relación con la aparición de tumores. Hoy está fuera de toda duda que la mutación somática está en el origen del cáncer. La transformación cancerosa requiere la presencia de más de una mutación, por lo que se postula la importancia que pueden tener las mutaciones que afectan a las líneas de defensa celulares frente a las mutaciones, en particular, los sistemas de reparación. Así, una deficiencia en un mecanismo de reparación confiere un fenotipo mutador que favorece la aparición de nuevas mutaciones.

Mutaciones somáticas (estudios *in vitro*). La mayoría de las veces se restringe el nombre de estudios *in vivo* a aquellos que se llevan a cabo con mamíferos. Por comparación, al resto se les denominan estudios *in vitro*. Los estudios *in vitro* incluyen no obstante estudios con insectos, en especial con *Drosophila*, con plantas, hongos, bacterias, etc., así como estudios con cultivos celulares tanto de células humanas, como células de otros mamíferos, primates, roedores, etc. Desde el punto de vista de la simplicidad técnica, rapidez y sensibilidad, los ensayos *in vitro* son sin discusión mucho más ventajosos que los estudios *in vivo*. Teniendo en cuenta que según el “CAS (Chemical Abstracts Service) REGISTRY” están registrados más de 65 millones de compuestos químicos se explica que la mayor parte de los datos sobre los posibles efectos genéticos de los compuestos químicos se hayan obtenido mediante estudios *in vitro*, y en particular mediante estudios de mutagénesis en bacterias, que con diferencia son los estudios más sencillos, baratos y sensibles. No obstante, a pesar de las ventajas de los ensayos *in vitro*, el volumen de trabajo es de tal naturaleza que sólo unos miles de compuestos de todos los millones conocidos están registrados por la EPA (Agencia de Protección Ambiental Americana), de los cuales además sólo una pequeña parte están evaluados en su potencial genotóxico, siendo estos primordialmente aquellos compuestos que se comercializan en grandes cantidades.

Evaluación del riesgo genético humano. Dado el tipo de datos disponibles se puede decir que la estimación del riesgo genético en humanos no deja de ser hoy en día un ejercicio de extrapolación de por ejemplo de experimentos a dosis altas a situaciones de exposición crónica a dosis bajas o bien de unas especies y tipos celulares a otras especies y tipos celulares distintos, o de un incremento en la tasa de mutación de loci específicos a un deterioro en definitiva de la salud

humana. Toda esta extrapolación se basa además en un supuesto: la existencia de una relación dosis-respuesta lineal. No obstante, dicha suposición hay que tomarla con cautela puesto que existen datos que apoyan la existencia de un nivel umbral, por debajo del cual las células humanas repararían con eficacia los daños genéticos inducidos, por ejemplo, a dosis bajas de las radiaciones.

Ensayos para la detección de genotoxinas

Existe una gran preocupación sobre las posibles propiedades mutagénicas de cualquier sustancia que entra en el cuerpo humano, ya sea por la piel, por el sistema digestivo, o por el aparato respiratorio. Por ejemplo, se está prestando una gran atención a los materiales residuales de la contaminación del aire y del agua, a los conservantes y aditivos de los alimentos, a los edulcorantes artificiales, a los herbicidas y pesticidas y a los productos farmacéuticos.

A lo largo de los años se ha puesto a punto un elevado número de ensayos cuyos objetivos son: i) identificar agentes genotóxicos, ii) cuantificar su activar genotóxica, y iii) estimar, en la medida de lo posible, el riesgo que la exposición a dichos agentes pueda tener para la salud humana.

Buena parte de los conocimientos actuales en biología molecular derivan de estudios llevados a cabo con microorganismos, por lo que no es de extrañar que los ensayos microbianos desempeñen un papel relevante en la detección de agentes genotóxicos. Dentro de los ensayos microbianos destacan los ensayos bacterianos (fundamentalmente ensayos con bacterias gram-negativas como *Samonella typhymurium* y *Escherichia coli*) y dentro de ellos los que tienen por finalidad la detección de agentes mutagénicos.

Reversiones frente a mutaciones directas. Los ensayos bacterianos que persiguen la detección de agentes mutagénicos se clasifican en dos categorías: ensayos de reversiones y ensayos de mutaciones directas. Estos ensayos deducen la ocurrencia de mutaciones por cambios habidos en el fenotipo. Se habla de mutación directa cuando se parte de un fenotipo silvestre que por mutación convertimos en un mutante y de reversión cuando se va en sentido opuesto, es decir, se parte de un determinado fenotipo mutante que por mutación se vuelve al fenotipo silvestre.

Los ensayo bacterianos de mutagénesis, sean de reversiones o de mutaciones directas, están diseñados para la detección de mutaciones génicas (no detectan clastógenos). Los ensayos de reversiones detectan exclusivamente mutaciones puntuales: sustituciones (transiciones y transversiones) y desfases. Los ensayos

de mutaciones directas además de las puntuales pueden detectar pequeñas deleciones, inserciones o reorganizaciones génicas.

La principal diferencia entre mutación directa y reversión estriba en la especificidad del evento. Las mutaciones directas se dicen inespecíficas porque, en principio, podremos producir un mutante induciendo cualquier tipo de mutación en el silvestre, sea esta sustitución o mutación de cambio de fase. En contraposición, la reversión es un fenómeno altamente específico. La reversión en sentido estricto supone la restauración no sólo del fenotipo, sino también del genotipo silvestre. La reversión es un fenómeno altamente improbable por lo que normalmente cuando hablamos de reversión estamos hablando de un fenómeno distinto, la supresión. Se habla de supresión cuando por mutación (denominada supresora) se restaura el fenotipo silvestre aún cuando no se restaura su genotipo).

Ensayo His. El ensayo bacteriano de uso más extendido se conoce como ensayo His, de la histidina, de *Salmonella* o de Ames ³⁵. Esta diversidad de nombres derivan del hecho de que fue desarrollado por el grupo del profesor Bruce Ames, catedrático de bioquímica de la universidad de Berkeley, utiliza la bacteria *Salomonella typhymuriun*, y se basa en la reversión de un fenotipo His⁻ (autrofia para la histidina: no crecimiento en medio mínimo sin histidina) en His⁺ (prototrofia para la histidina: crecimiento en medio mínimo sin histidina).

¿Cómo se detecta la actividad mutagénica de un agente revertiendo un auxótrofo His⁻? Se inocula un cultivo con unas pocas bacterias His⁻ y se deja crecer hasta fase estacionaria (unas 10⁹ bacterias/ml). En ese cultivo la inmensa mayoría serán His⁻, por consiguiente incapaces de crecer en un medio mínimo sin histidina. Unas pocas bacterias serán His⁺ por mutación espontánea. En un tubo de ensayo con unos 2 ml de agar fundido, se añade una alícuota del cultivo, pongamos 10⁸ bacterias que irán en 0,1 ml del cultivo original. Agitamos suavemente el contenido del tubo y se vierte sobre la superficie de una caja de Petri con medio mínimo sin histidina. El agar se solidifica con rapidez y sirve para la perfecta distribución de los 100 millones de bacterias en la caja de Petri. Al no haber histidina sólo crecerán aquellas bacterias que por mutación espontánea hayan revertido a His⁺. Esto supone una frecuencia o tasa de reversión del orden de 10⁻⁷. El posible agente objeto de estudio tendrá actividad mutagénica si consigue incrementar este valor de reversión espontánea. En otro tubo se ponen las bacterias en presencia de una determinada cantidad del compuesto. Si se observa en tal caso un número significativamente superior de colonias His⁺, se puede concluir que el compuesto posee actividad mutagénica (Figura 22).

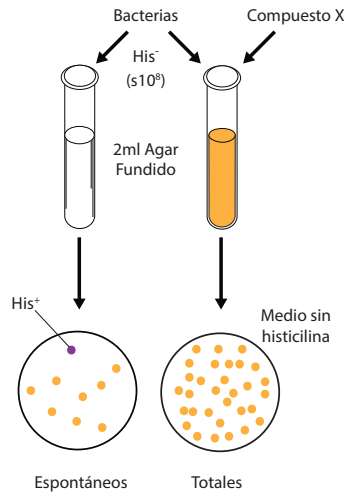


Figura 22. Esquema del protocolo del ensayo His, también conocido como ensayo de la histidina, de *Salmonella* o de Ames.

El ensayo de Ames utiliza cuatro cepas de la bacteria *Salmonella typhimurium* que han sido seleccionadas por su sensibilidad y especificidad a la mutagénesis. Unas cepas se utilizan para detectar sustituciones de pares de bases, y las otras detectan varias mutaciones de cambio de sentido.

Muchas sustancias que entran en el cuerpo humano son relativamente inocuas hasta que se activan metabólicamente, generalmente en el hígado, en productos químicamente más activos. Así, el ensayo de Ames incluye un paso en el que el compuesto que se desea probar se incuba *in vitro* en presencia de un extracto de hígado de mamífero. Otra alternativa es inyectar los compuestos en ratones para que las enzimas de su hígado los modifique, y luego se recuperan para ser usados en el ensayo de Ames.

Este sencillo ensayo de mutagénesis se dice en cajas porque el compuesto se añade junto con las bacterias a las cajas selectivas, es decir, las cajas en las que se seleccionan los revertientes. Puesto que las colonias revertientes son claramente visibles a los 2 días de incubación a 37°C, el ensayo en cajas equivale a un experimento de exposición crónica.

En la actualidad, se disponen de kits comerciales que usan microplacas de pocillos con todo lo necesario para llevar a cabo el test. El cambio de color de morado a amarillo es indicativo de la ocurrencia de reversión (Figura 23).

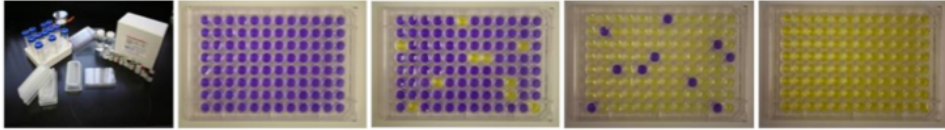


Figura 23. Kit comercial del ensayo de Ames.

El ensayo de la His es además un ensayo cuantitativo. La respuesta mutagénica se cuantifica como la diferencia entre el número de colonias revertientes que se observan en presencia del compuesto y las colonias que surgen por reversión espontánea y que aparecen en las cajas sin compuesto. La diferencia entre totales y espontáneos serán los revertientes inducidos por el compuesto objeto de estudio.

De un compuesto se ensayan varias dosis. El número de revertientes inducidos por las diferentes dosis se representan en función de la misma, obteniéndose la correspondiente relación dosis-respuesta. Con frecuencia la relación dosis-respuesta es lineal, o tiene una porción lineal. En estos casos, la respuesta mutagénica se expresa en función de la pendiente de la correspondiente recta de regresión. La pendiente nos dará el número de revertientes inducidos, por término medio, por cada unidad de dosis lo que equivale a la potencia mutagénica.

Normalmente se exigen dos condiciones para que un determinado agente sea considerado mutagénico: i) que se obtenga una relación dosis-respuesta, y ii) que, al menos en una dosis el número de revertientes totales duplique el valor espontáneo.

En el uso inicial del ensayo de Ames, en la década de los 70, se examinó un elevado número de carcinógenos conocidos, y se vio que más del 80 por ciento son potentes mutágenos. Esto no es sorprendente, ya que la transformación de las células a un estado maligno se produce como resultado de alguna mutación. Aunque una respuesta positiva en el ensayo de Ames no demuestra que un compuesto sea carcinogénico, el ensayo de Ames es útil como mecanismo preliminar de rastreo. Así, el ensayo de Ames se utiliza mucho en el desarrollo industrial y farmacéutico de sustancias químicas. Una demostración de su utilidad fue el descubrimiento, ya en 1975, de que la mayoría de los tintes para el cabello comercializados en los Estados Unidos contenían compuestos que eran mutagénicos en las bacterias ³⁶ siendo posteriormente eliminados de la mayoría de esos tintes.

Los mecanismos de acción mutagénica de genotoxinas concretas han puesto de manifiesto que hay grupos de mutágenos que actúan de forma altamente específica. Por ejemplo, los agentes alquilantes monofuncionales como la etilnitrosourea (ENU) inducen preferentemente sustituciones, preferentemente transiciones y en concreto transiciones GC→AT. Además, preferentemente se muta la G precedida en 5' por una purina, y sobre todo si la purina en 5' es otra G. La especificidad es tan alta, que por ejemplo el efecto 5'-Pu no se observa con el etilmetanosulfonato (EMS), otro agente etilante monofuncional que introduce en el DNA el mismo tipo de lesiones que la ENU.

La estirpe TA100 del ensayo de la His, es un auxótrofo His⁻ que revierte por sustituciones que tengan lugar en un blanco genético formado por tres pares GC. Por su parte, la estirpe TA102 revierte por sustituciones que ocurren en un blanco genético formado por tres pares AT. Estas estirpes son útiles, por lo tanto, para detectar agentes que induzcan sustituciones. Para los compuestos que inducen desfases requieren el uso de estirpes sensibles a estos cambios mutacionales. El test de Ames tiene dos, TA98 y TA97. La estirpe TA98 alterna pares GC/CG un su secuencia blanco, mientras que en la TA97 se suceden 6 pares GC. Ambas estirpes son particularmente sensibles a reversión por mutaciones de cambio de fase, dado que en una zona con repeticiones, se producen con facilidad desplazamientos de una de las dos cadenas durante la síntesis del DNA.

Estas cepas de Salmonella (TA100, 98, 97 y 102) presentan tres características genéticas cuyo objetivo es el incrementar la sensibilidad de las mismas a la acción de los mutágenos:

- i) Llevan una mutación *uvr* que les confiere deficiencia en uno de los más importantes mecanismos de reparación, denominado mecanismo de reparación por escisión de nucleósidos (NER). Se trata de un mecanismo de reparación inespecífico, es decir, activo sobre distintos tipos de daños, normalmente daños que distorsionan la estructura regular de la molécula del DNA.
- ii) Llevan una mutación *rfa* que elimina la pared bacteriana que supone una barrera infranqueable para compuestos de gran tamaño.
- iii) Las estirpes TA1535, 1538 y 1537 sólo llevan esas dos deficiencias. La TA100, 98 y 97, derivan de ellas y se diferencian en que portan un plásmido pKM101. Este plásmido codifica unas proteínas Muc que disminuyen la fidelidad de la síntesis del DNA.

La dimetilnitrosoamina (DMN), un poderoso agente alquilante, a pesar de ser un potente mutágeno en mamíferos no lo es en bacterias. Gabridge y Legator [37] comprobaron con el ensayo a través del hospedador que la DMN era convertida por los mamíferos en un producto activo, conversión que no podían llevar a cabo las bacterias.

Para llevar a cabo tal ensayo se obtiene un cultivo estacionario de la bacteria indicadora (por ejemplo una de las estirpes del test de Ames), se concentra 10 veces y se toma una alícuota de 0,1 ml. Se introducen las bacterias en el interior del animal (rata o ratón, por ejemplo) por inyección peritoneal o bien por inyección intravenosa (la sangre distribuye rápidamente las bacterias que llegan a todos los órganos, incluido el principal órgano metabolizante, el hígado). A los pocos minutos se suministra el compuesto. En el caso de la DMN, genotoxina ambiental que contamina por vía oral, la introducción en el huésped se hace mediante una cánula que llega al estómago. Tras un periodo de incubación, se sacrifica al animal, se le extrae el hígado, se homogeniza y se recuperan las bacterias. De la misma forma se procede con animales controles a los que se le suministra agua (disolvente de la DMN). Finalmente se siembran mutantes. Si se recuperan más mutantes de los animales tratados con la DMN, el compuesto es mutagénico. Con este protocolo la DMN resultó un mutágeno muy potente en bacterias.

Los mutágenos que sólo resultan mutagénicos tras su conversión metabólica en mamíferos se denominan mutágenos indirectos o bien pre- o pro-mutágenos. Estos agentes se dicen requerir activación metabólica. La activación corre a cargo de enzimas microsomales, presentes en el retículo endoplasmático de las células eucarióticas. Los mutágenos que no requieren activación metabólica, como la ENU, se dicen mutágenos directos.

Malling y de Serres ³⁸ reprodujeron *in vitro* la activación de la DMN, incubando bacterias y compuesto en un tubo de ensayo junto con una fracción microsomal purificada a partir de hígado de rata. Esta activación *in vitro* fue incorporada de forma rutinaria a los ensayos de mutagénesis con bacterias. Bacterias, compuesto y la denominada fracción S9 se añaden conjuntamente a las cajas para la selección de revertientes His⁺. La fracción S9 resulta tras centrifugar a 9000g –de aquí su nombre– un homogeneado de hígado de ratas macho. El órgano elegido es el hígado porque se trata del órgano metabolizante por excelencia. El animal puede ser sustituido por otra especie como el ratón, hámster incluso hígados humanos provenientes de autopsias. El sexo macho se elige para evitar fluctuaciones hormonales. Teniendo en cuenta la inducibilidad

de las enzimas que participan en la activación metabólica, éstas se inducen previamente en el animal antes de extraerle el hígado. El inductor puede ser Aroclor, una mezcla de policlorinados bifenilos, β -naftoflavona, metilcolantreno, etc. Hoy día, la fracción S9 se comercializa. Con respecto a su adición en los ensayos de mutagénesis hay que tener presente que:

- La fracción S9 no equivale al hígado tal cual, es una fracción del mismo.
- No todos los compuestos se activan en el hígado, o no lo hacen predominantemente en este órgano sino en otros como pulmones, riñones, etc.
- Existen importantes diferencias interespecíficas en cuanto a las transformaciones metabólicas.
- Hay activaciones metabólicas a cargo de enzimas no microsomales.

Un compuesto que requiere activación metabólica para ser mutagénico en bacterias es el benzo-a-pireno (BaP). Se trata de un hidrocarburo aromático policíclico (PAH) de enorme importancia ambiental. En la ruta de detoxificación del BaP, donde se le añaden grupos hidroxilos para incrementar su solubilidad, y así facilitar su excreción en orina, surge un intermediario con un grupo epóxido muy reactivo. Dicho intermediario reacciona con la G en los pares GC del DNA dando lugar a mutaciones, fundamentalmente desfases por su capacidad para intercalarse entre las bases.

Ensayo Ara. La especificidad de los ensayos como el de la His basados en la reversión de mutaciones específicas tiene ventajas e inconvenientes. Un inconveniente es que dicha especificidad obliga a la utilización de una batería de estirpes distintas, entre 4 y 5 en el test de Ames. Cada agente hay que ensayarlo además bajo condiciones experimentales diversas: presencia y ausencia de S9, rango amplio de concentraciones del compuesto, etc. Todo ello supone complejidad técnica y aumento de costes. A esto hay que añadir la duda de que con las estirpes probadas se hayan cubierto las especificidades mutagénicas posibles y la dificultad para predecir la potencia mutagénica de los agentes positivos. Un mutágeno muy específico en su mecanismo de acción mutagénica aparecerá como muy potente si dicha especificidad está representada en alguna de las estirpes del ensayo, aunque desde el punto de vista del genomio completo, fuese realmente un mutágeno débil. Por otro lado, un mutágeno poco específico que indujese una variabilidad de mutaciones en secuencias muy distintas daría una débil respuesta, o incluso no daría respuesta con las estirpes del ensayo. La

solución a estos problemas son los ensayos basados en la detección de mutaciones directas. Entre los aspectos positivos de los ensayos de reversiones está que nos dan una idea de la especificidad mutagénica del compuesto, y como se basan en hechos improbables presentan una tasa baja de mutación espontánea. Por el contrario, los ensayos basados en la inducción de mutaciones directas, no nos dicen nada sobre la especificidad de los mutágenos y presentan tasas más altas de mutación espontánea.

El departamento de Genética de la universidad de Sevilla desarrolló en 1973 un ensayo de mutaciones directas llamado ensayo Ara o de resistencia a L-arabinosa ³⁹. La estirpe del ensayo tiene inactivado el gen *araD* del operón *araBAD* que controla el catabolismo del azúcar L-arabinosa. La estirpe es incapaz de crecer en presencia de L-arabinosa aun cuando se ponga otra fuente de carbono y energía en el medio de cultivo. Por esta razón la estirpe se dice sensible a L-arabinosa o Ara^S. La causa de la sensibilidad es la acumulación del sustrato de la reacción que cataliza la enzima L-ribulosa 5-fosfato 4-epimerasa que codifica el gen *araD*. Dicho sustrato, la L-ribulosa 5-fosfato es tóxico para las células.

El ensayo Ara busca mutantes en cajas de medio mínimo con L-arabinosa como agente tóxico y glicerina como fuente de carbono, seleccionándose mutantes Ara^R. La resistencia se adquiere inactivando genes como *araA* o *araB* que codifican la síntesis de enzimas que controlan pasos previos a la L-ribulosa 5-fosfato 4-epimerasa, evitando la acumulación del producto tóxico. Los tres genes forman parte de un operón y su transcripción está bajo el control de un gen regulador, *araC*. La inactivación de este gen evitaría la expresión de los tres genes estructurales y por tanto también la acumulación del producto tóxico, confiriendo resistencia. La inactivación de los genes AraA, araB o araC se consigue mediante cualquier tipo de mutación, por lo que se puede decir que el ensayo Ara es totalmente inespecífico.

Los pasos siguientes en el desarrollo de este sencillo ensayo de mutagénesis fueron los siguientes:

1. La estirpe se manipuló genéticamente con el fin de convertirla en una herramienta extraordinariamente sensible. Siguiendo los pasos de Ames se eliminó la pared bacteriana y el mecanismo fiel de reparación por escisión y se introdujo el plásmido pKM101.
2. Se desarrollaron protocolos experimentales rápidos, sencillos y baratos y además se automatizó parte del proceso.

3. Se ensayaron más de un centenar de compuestos químicos distintos demostrándose que:
 - i) El ensayo con una sola estirpe era capaz de detectar compuestos que se sabían altamente específicos en sus mecanismos de acción mutagénica.
 - ii) El ensayo respondía a mutágenos con estructuras químicas muy diversas: aminas aromática, halogenuros de alquilo, compuestos aromáticos policíclicos, ésteres, epóxidos, carbamatos, compuestos nitrosoaromáticos, nitrosaminas, compuestos azo, etc.
 - iii) El ensayo discriminaba igual o mejor que otros ensayos bacterianos entre carcinógenos y no carcinógenos.
 - iv) La sensibilidad del ensayo supera el millón de veces, discriminando perfectamente entre análogos estructurales, uno de los cuales es un potente mutágeno y/o carcinógeno mientras que el otro ni es una cosa ni la otra, o bien su potencia es significativamente inferior.

4. Por último, destacar su enorme utilidad en el estudio genotoxicológico de mezclas complejas de compuestos químicos. Las mezclas complejas contienen frecuentemente diferentes mutágenos que actúa de forma distinta. Su estudio mutagénico requiere de un ensayo sensible a cualquier mutágeno con independencia de su mecanismo de acción.

Estirpes sensibles a grupos específicos de mutágenos. El conocimiento de la genética de especies bacterianas como *Salmonella typhimutium* y *Escherichia coli* ofrece unas posibilidades casi infinitas de manipulación de las estirpes indicadoras con el fin no sólo de incrementar su sensibilidad en general, como sería la deficiencia en la reparación por escisión, sino la sensibilidad a grupos particulares de mutágenos. Por ejemplo en la bioactivación de ciertos compuestos químicos como los nitrofuranos, compuestos de enorme importancia por sus aplicaciones en medicina humana y veterinaria, entre otras, desempeña un papel clave la reducción de su grupo nitro a cargo de nitroreductasas mas o menos específicas. La estirpe BA146 combina el ensayo Ara con la sobreproducción de dicha actividad nitroreductasa.

Se sabe que una actividad N-acetil transferasa es vital para la bioactivación de compuestos nitroaromáticos de enorme importancia como contaminantes ambientales. La estirpe BA149 sobreproduce dicha actividad.

El ensayo Ara también se ha combinado con deficiencias en sistemas reparadores específicos, y en mecanismos de defensa concretos, como las catalasas y las superóxido dismutasas que protegen de los daños oxidativos del peróxido de hidrógeno y anión superóxido, respectivamente.

Valor predictivo de los ensayos bacterianos de mutagénesis. La importancia de los ensayos bacterianos de mutagénesis se evalúa en función de su capacidad para predecir la actividad carcinogénica de los compuestos químicos. En 1975 Ames y colaboradores ⁴⁰ publican un artículo que recoge los resultados de mutagénesis de 300 compuestos químicos distintos, cuya actividad carcinogénica había sido investigada en animales de experimentación (ratas y ratones). Los resultados de este trabajo se resumen de la siguiente forma:

1. El 90% de los carcinógenos resultaron mutagénicos en *Salmonella*. El porcentaje de carcinógenos positivos en un ensayo de genotoxicidad define su sensibilidad.
2. Un porcentaje bastante alto (87%) de no carcinógenos resultaron no mutagénicos. El porcentaje de no carcinógenos negativos define la especificidad del ensayo.
3. Los carcinógenos no mutagénicos pasaron a llamarse falsos negativos (10%). En el trabajo atribuyen la no mutagenicidad de estos carcinógenos a problemas de actividad metabólica. El hecho de que algunos carcinógenos no fuesen detectados mutagénicos por el ensayo de la His promovió la búsqueda de nuevos ensayos de mutagénesis que pudieran complementar al test de Ames. Entre ellos destacarían aquellos encaminados a la detección de compuestos clatogénicos, es decir, compuestos que principal o exclusivamente indujesen alteraciones cromosómicas en lugar de mutaciones puntuales.
4. Los mutágenos no carcinógenos pasaron a llamarse falsos positivos (13%). La mayoría de los falsos positivos se atribuyeron a problemas relacionados con la sensibilidad de los ensayos de carcinogénesis, recomendándose su re-ensayo, modificándose la especie, la ruta de administración, etc. El uso de la furilfuramida (AF-2) como aditivo alimentario se aprobó en Japón en el año 1965. En 1971 en un estudio con ratas no se encontraron pruebas de actividad carcinogénica. No obstante, un año después se demostró su capacidad mutagénica en *Salmonella*. Con base en los datos de mutagénesis se revisó la supuesta no carcinogenicidad del compuesto. En 1974 se demostró su carcinogenicidad y a partir de este momento se prohibió su uso.

Diferentes trabajos publicados a mediados de los 70, llegaron a la misma conclusión: el ensayo de la His es un ensayo de gran fiabilidad (seguridad en torno al 90%) en la predicción de la actividad carcinogénica. Esta conclusión es de enorme relevancia dada la complejidad de los ensayos de carcinogénesis y la simplicidad del ensayo mutagénico propuesto. En su conjunto, estos trabajos constituyeron un soporte experiencial valiosísimo de la teoría formulada por K. H. Bauer en 1928 (Mutationstheorie) de la mutación somática como causa y origen del cáncer. Dicha teoría predice la actividad mutagénica de los carcinógenos, confirmada experimentalmente por una serie de trabajos. Otros dos soportes experimentales de gran importancia son: la alta incidencia de tumores en pacientes con deficiencias en mecanismos de reparación (xeroderman⁴¹) y la activación de oncogenes por mutación de proto-oncogenes.

Una década después de que Ames y otros autores demostraran una sensibilidad del 90%, diversos estudios utilizando datos de carcinogénesis del Instituto Nacional del Cáncer y del Programa de Toxicología Nacional de los Estados Unidos, encontraron valores de sensibilidad muy inferiores, en torno al 50%. La clave para entender esta pérdida aparente de sensibilidad por parte del ensayo de la His se encuentra en el estudio publicado por Ashby y Tennant en 1988⁴², revisado y ampliado en 1991⁴³.

El estudio realizado en el marco del Programa de Toxicología Nacional Americano relaciona la estructura química, mutagenicidad y carcinogenicidad de un total de 301 compuestos químicos. La estructura química de los compuestos objeto de estudio se analizó con el fin de identificar las llamadas alertas estructurales. Las alertas estructurales son grupos químicos susceptibles de reaccionar con el DNA con base en su naturaleza electrofílica. Es decir, grupos químicos que por su naturaleza electrofílica reaccionarían con los centros nucleofílicos de la molécula de DNA, en particular las bases nitrogenadas. Por ejemplo, son alertas estructurales el grupo nitro aromático, monohaloalqueno, epóxido aromático, amina aromática, etc.

En este estudio, la carcinogenicidad o no carcinogenicidad de los compuestos químicos se decidió con base en estudios de exposición crónica en roedores, ratas y ratones de ambos sexos. La mutagenicidad o no mutagenicidad de los compuestos se decidió con base en el ensayo de la histidina en *Salmonella*. Uno de las cosas que puso de manifiesto el estudio es que la sensibilidad y especificidad depende del tipo de compuesto químico. Los 301 compuestos se dividieron en dos grupos, compuestos con alertas (154) y sin alertas (147). La presencia de grupos reactivos en la molécula de un compuesto es una característica

íntimamente ligada a sus propiedades mutagénicas. Así, la mayoría de los compuestos con alertas resultaron mutagénicos (78%). En contraposición, muy pocos compuestos sin alertas dieron resultados positivos en el ensayo de la histidina (4%). En términos de predicción, el ensayo de la histidina es capaz de predecir la mayoría de los carcinógenos con alertas (84%), especialmente los activos en ambas especies (93%) y más aún los pertenecientes a ciertos grupos. En contraposición el ensayo de la histidina es prácticamente insensible a los compuestos carentes de grupos alertas.

Otro aspecto a destacar del estudio lo constituye los tejidos sensibles a la acción carcinogénica de los diferentes grupos de compuestos. De los 16 tejidos diana de estudio, dos tejidos, el pulmón y la glándula de Zymbal, se mostraron particularmente sensibles a la acción de los carcinógenos con alertas y con actividad mutagénica. Comparativamente otros 4 tejidos (hígado, riñón, sistema hemopoyético y tiroides) se asociaron con carcinógenos sin alertas ni capacidad mutagénica.

Con base en los resultados obtenidos los autores proponen la división de los carcinógenos en mutagénicos y no mutagénicos.

Los carcinógenos mutagénicos son compuestos químicos capaces de reaccionar con el DNA por la presencia en su molécula de algún grupo electrofílico. Tales compuestos inducirían el desarrollo de un tumor tras su interacción con el DNA. Son efectivos a dosis relativamente bajas y en exposiciones relativamente cortas. Son predominantemente activos en ambas especies y en varios tejidos. La carcinogenicidad de los carcinógenos mutagénicos se puede predecir con base en su actividad mutagénica. En este sentido la mutagénesis en bacterias es un indicador muy útil, puesto que un resultado positivo significa una alta probabilidad de encontrarnos ante un carcinógeno animal.

Los carcinógenos no mutagénicos son compuestos químicos sin grupos electrofílicos y por consiguiente incapaces de reaccionar con el DNA e iniciar el desarrollo de un tumor. La inducción de tumores por los carcinógenos no mutágenos, en particular en el hígado de ratón, se produciría mediante un mecanismo no ligado a la mutagenicidad ni a la reactividad del compuesto con el DNA. La actividad de los llamados carcinógenos no mutagénicos no se puede predecir con ensayos de mutagénesis. Se detectan mediante protocolos de carcinogénesis de exposición crónica a largo plazo y a dosis altas. Se piensa que la carcinogenicidad de estos agentes resulta de la respuesta biológica de ciertos tejidos ante la exposición continuada a los mismos.

Por razones éticas obvias es imposible obtener pruebas experimentales directas del potencial carcinogénico de agentes específicos en humanos. Con la excepción de accidentes fortuitos, exposiciones no deseadas de los trabajadores de ciertos procesos industriales y situaciones de guerra, sólo las investigaciones epidemiológicas a largo plazo proporcionan información sobre la carcinogenicidad en el hombre de ciertos agentes ambientales. La dificultad que conllevan los estudios epidemiológicos explica que muy pocos compuestos químicos o combinaciones diversas de compuestos hayan sido reconocidos carcinogénicos en humanos por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC). Entre ellos, con la excepción de los estrógenos, no hay ningún compuesto químico orgánico que carezca de actividad mutagénica y sea considerado por tanto carcinógeno no genotóxico.

Ensayos genotóxicos no mutagénicos

Bacterias. En bacterias también se han puesto a punto otros ensayos que se podrían clasificar como genotóxicos, en el sentido de que persiguen cuantificar la inducción de daños en la molécula del DNA, pero que no son mutagénicos en cuanto no miden la inducción de mutaciones, es decir, cuantifican daños en general con independencia de que éstos en definitiva acaben transformándose o no en mutaciones.

Entre estos tipos de ensayo está el llamado SOS cromotest ⁴⁴. La respuesta SOS es una respuesta de emergencia cuyo objetivo es asegurar la supervivencia celular, aun a costa de la disminución en la fidelidad en la síntesis del DNA y por tanto de una producción de mutaciones tras la replicación de lesiones letales. La respuesta SOS conlleva la inducción de la expresión de una serie de genes.

El SOS cromotest utiliza como estipe indicadora una bacteria que tiene el promotor de uno de estos genes, *sfi*, unido al gen *lacZ* mediante una fusión génica. Dicha fusión génica permite cuantificar la expresión del gen en función de los niveles de β -galactosidasa mediante un ensayo colorimétrico. Se ensayan varias dosis del posible compuesto genotóxico. Para cada dosis se estima el factor de inducción (cociente entre la actividad β -galactosidasa en presencia del compuesto y en su ausencia). Se obtiene la correspondiente curva dosis-respuesta. La pendiente de la porción lineal se denomina SOSIP (SOS Induction Potency), parámetro que cuantifica la capacidad de inducción de los agentes probados. La mayor ventaja de este ensayo es su rapidez, horas frente a días que duran los ensayos de mutagénesis, además actualmente existen kits comerciales disponibles de este ensayo (Figura 24).

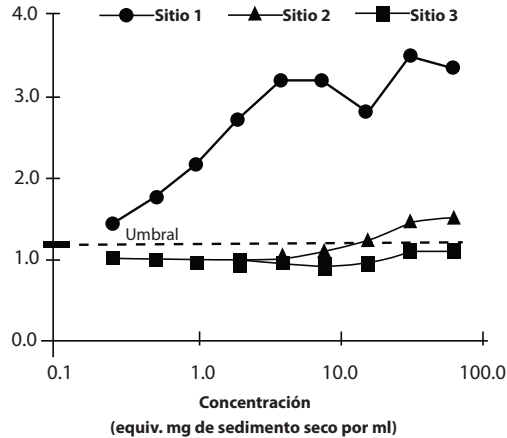


Figura 24. Respuesta genotóxica de *E. coli* PQ37 (SOS cromotest) expuesta a extractos de sedimentos orgánicos de tres sitios contaminados con compuestos orgánicos [45].

De particular relevancia son aquellos ensayos no mutagénicos diseñados para la detección de eventos genéticos a los que resultan insensibles los ensayos bacterianos (alteraciones cromosómicas, roturas cromosómicas, recombinación genética, no disyunción mitótica o meiótica, etc.) y que se llevan a cabo en situaciones que reflejan con máxima exactitud el complejo sistema metabólico de los mamíferos.

Cultivos celulares. Las células de mamífero en cultivo permiten diversos ensayos, incluidos ensayos de mutagénesis. Los basados en la detección de mutaciones génicas, sean de mutaciones directas o reversiones, son básicamente iguales que los ensayos descritos en bacterias, variando no obstante el método de selección. En células de mamífero se han utilizado como blanco genético básicamente 4 genes. Dos de ellos son el gen *hgp_{prt}* que codifica la hipoxantina guanina fosforibosil transferasa y el gen *tk* que codifica la timina kinasa. Ambos ensayos se basan en que las células con el gen silvestre son sensibles a un compuesto, 6-tioguanina en el primer caso y trifluortimidina en el segundo, que transforman en un derivado tóxico, mientras que los mutantes son resistentes. Una diferencia interesante es que el gen de la *Hgp_{prt}* se localiza en el heterocromosoma X, por lo que todas las mutaciones se expresan (sólo una copia de X en machos y sólo una copia activa en hembras), mientras que el gen de la *Tk* se localiza en una autosoma (hay que usar líneas celulares heterocigóticas *tk⁺/tk⁻*). Otra diferencia es que en el cromosoma X se localizan muchos genes

vitales, algunos de los cuales son adyacentes a *hgp*rt, por ello las deleciones grandes no son viables. Esto hace que el ensayo HPGRT se considere específico de mutaciones puntuales y pequeñas deleciones. En contraposición, el ensayo TK detecta deleciones de gran tamaño. Las líneas celulares que más se usan son células CHO (células de ovario de hámster chino) para HPGRT y células L5178Y de linfoma de ratón para el ensayo TK.

En los cultivos celulares no sólo se pueden cuantificar la inducción de mutaciones génicas sino también la inducción de mutaciones cromosómicas, sean estructurales o numéricas, aunque fundamentalmente se detectan aneuploidías, es decir la pérdida de cromosomas individuales. Los daños cromosómicos se visualizan en metafase. Experimentos de exposición con rayos X llevados a cabo con linfocitos periféricos humanos, mostraron la aparición de cromosomas dicéntricos (dos centrómeros) y fragmentos acéntricos. La exposición de células vegetales al agente alquilante Myleran dio apareamientos en forma de cruz entre dos cromosomas homólogos fruto de una traslocación asimétrica (Figura 25).

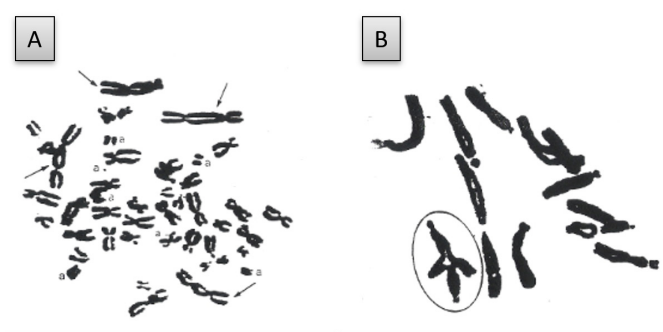


Figura 25. A: cultivo de linfocitos humanos expuestos a rayos X (~300 rads) mostrando varias aberraciones cromosómicas: cromosomas dicéntricos indicados con flechas y fragmentos acéntricos indicados con la letra "a". B: células de raíz de habas expuestas a Myleran (mM. 3h) mostrando un apareamiento cromosómico en forma de cruz (indicado por el círculo) resultado de una translocación asimétrica.

Otro ensayo citogenético es el llamado intercambio entre cromátidas hermanas, abreviado SCE (Siter Chromatid-Exchanges). Se basa en la tinción diferencial de las cromátidas hermanas. Para ello las células se ponen en presencia de 5-bromodeoxiuridina (análogo de la timina) durante 2 ciclos de replicación. Teniendo en cuenta la replicación semiconservadora, la incorporación de 5-bromodeoxiuridina será doble en una cromátida que en la otra. La tinción diferencial de las cromátidas permite cuantificar los intercambios. Los

cromosomas con intercambios se dicen arlequinados (Figura 26).

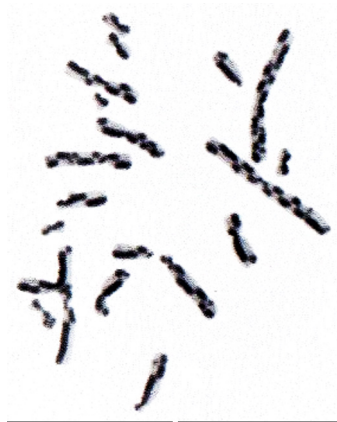


Figura 26. Cromosomas arlequinados.

Otro ensayo genotóxico no mutagénico es el de la síntesis no programada del DNA, abreviado UDS (Unscheduled DNA synthesis)⁴⁶. Cuando un DNA se daña tiene lugar una síntesis no programada de DNA cuyo objeto es la reparación del mismo. El test se basa en la incorporación de timidina marcada con tritium en el DNA de células que no están en la fase S del ciclo celular. La principal ventaja de este ensayo es que no requiere que las células se repliquen por lo que se puede llevar a cabo en cualquier tipo celular. Los hepatocitos se usan frecuentemente en este tipo de ensayo dada su capacidad de activación metabólica, de la que carecen otros tipos celulares y la mayoría de las líneas celulares establecidas. También se usan fibroblastos humanos en presencia de S9.

Animales de experimentación. Los ensayos anteriormente descritos se pueden llevar a cabo sustituyendo la exposición controlada en el tubo de ensayo por la exposición de un animal. Tras la exposición el animal es sacrificado, se extraen las células y se efectúa el análisis, SCR, UDS, alteraciones cromosómicas, etc.

Un ensayo citogenético que se puede llevar a cabo con animales de experimentación, concretamente ratones, es el ensayo de micronúcleos. Se trata de un ensayo *in vivo*, relativamente sencillo y rápido. Los eritrocitos maduros carecen de DNA, a no ser que los eritrocitos inmaduros hayan sufrido daño cromosómico. En tal caso, fragmentos cromosómicos procedentes de

roturas, o bien cromosomas que no han segregado normalmente resultado de alteraciones cromosómicas, pueden quedar en los eritrocitos maduros formando micronúcleos. Cuanto mayor sea el número mayor será el daño.

Los ensayos anteriores de una u otra forma analizan daños que ocurren en las células somáticas y que en principio pueden ser relevantes para el individuo que las sufre, dada la correlación entre daños genéticos y cáncer, pero no para su descendencia si estos daños no ocurren en la línea germinal. Existen no obstante ensayos que cuantifican daños en la línea germinal. El más importante es el test de *locus* específico, abreviado SLT (Specific Locus Test). Desarrollado por WL Russell en 1951 en ratones. Un macho silvestre se cruza con una hembra que lleva en homocigosis múltiples mutaciones recesivas que afectan a características morfológicas fáciles de distinguir como el color del pelo o de los ojos, forma de las orejas, etc. En la descendencia se busca la aparición de dichas características que serán el fruto de la inducción de mutaciones en el parental masculino. Se puede investigar la sensibilidad de los compuestos en los diferentes estadios de la espermatogénesis. Los resultados obtenidos con este ensayo son escasos dado que es costoso y laborioso. Un ensayo similar se lleva a cabo en *Drosophila*, y si bien hay más datos que en ratón, estos son menos relevantes desde el punto de vista de la estimación de riesgo en humanos.

Un ensayo más sencillo y menos costoso es el llamado ensayo de letales dominantes. La diferencia estriba en que se analiza la inducción de daños letales que se traducen en una disminución de la supervivencia de la descendencia. Se tratan ratas o ratones machos que se cruzan con hembras sin tratar y se buscan lesiones que disminuyen la viabilidad del feto. Un ensayo similar también existe en *Drosophila*.

En la actualidad se comercializan ratones transgénicos para ensayos de mutagénesis. En líneas generales con todos los ratones transgénicos el protocolo es el mismo. Se tratan los animales, se sacrifican, se extraen los distintos tejidos, se aísla el DNA y se seleccionan los mutantes.

En el ensayo MutaTMMouse (Covance) el blanco para la acción de los mutágenos en el gen *LacZ* de *E. coli*. Dicho blanco (3,1 Kb) está inserto en un vector derivado del fago lambda (47 Kb) que facilita su recuperación y posterior análisis de las mutaciones. En torno a 40 copias del vector con su blanco se inserta en el genoma del ratón. El DNA extraído se incuba *in vitro* con las distintas piezas que forman la envoltura del fago y una vez empaquetado se usa la vía normal de infección para introducir las copias empaquetadas en las partículas fágicas en el interior de las bacterias indicadoras que informarán de la

presencia de mutaciones en el gen *LacZ*. Si el gen no está mutado las bacterias sintetizan β -galactosidasa que descompone X-gal, dando halos de lisis de color azul. Si está mutado da halos de lisis de color blanco. También puede usarse una bacteria con una mutación en el gen *galE* que codifica una epimerasa. Las bacterias silvestres expresan β -galactosidasa que descompone lactosa en glucosa y galactosa que mata a las células. Por su parte, los mutantes, con una fuente adicional de carbono, sobreviven.

Otra variante usa el gen *LacZ* en un plásmido. El gen *LacZ* está prededido por un operador *LacO* al que se une un represor *LacI*. El represor se une a una bola magnética, de manera que con un imán se recupera con facilidad y alta eficiencia el blanco genético del total del DNA sin necesidad de empaquetamiento *in vitro* ni de llevar a cabo la infección, dado que se introduce por transformación mediante electroporación.

Otro ratón disponible comercialmente para estudios de mutagénesis se denomina Big Blue™ (Agilent Technologies). El ratón lleva en distintos órganos copias múltiples de un vector lanzadera (43 Kb). El vector tiene los extremos cos (cohesivos) del fago lambda, es decir extremos monocatenarios de secuencias complementarias, que hacen que las distintas copias se integren en el DNA genómico en forma de grandes concatémeros. El blanco genético es el gen bacteriano *LacI*, además lleva el gen *LacZ* y un gen que confiere resistencia a ampicilina. Tras tratar al animal con el agente se extraen los tejidos y se aísla el DNA. El DNA se empaqueta en el fago lambda, se infecta una determinada bacteria y se aíslan halos de lisis, que si son de color azul son indicativos de que las bacterias fueron infectadas por un mutante *LacI*. En tal caso, el represor no está activo y se produce la síntesis de β -galactosidasa que transforma X-gal del medio en galactosa mas 5-bromo-4-cloro-indigo (sustancia que confiere color azul).

Los ejemplos anteriores de uso de animales transgénicos para estudios de mutagénesis están basados en la inducción de mutaciones directas, por tanto sensibles a distintos tipos de daños en el DNA. No obstante, hay que decir que también existe un ensayo basado en la reversión de una mutación sin sentido.

Por último, decir que este tipo de estudios, aunque últimamente se están perfeccionando, no dejan de ser laboriosos y costosos. Un aspecto importante es el tiempo de expresión, es decir, el tiempo que transcurre desde que se hace el tratamiento hasta que se sacrifica el animal para la cuantificación de la frecuencia de mutación y el posterior análisis de las mutaciones por secuenciación. Durante este tiempo la sustancia se distribuye a los distintos órganos, se metaboliza, daña

la molécula de DNA, tiene lugar la reparación y la replicación para la fijación de las mutaciones a partir de las lesiones no reparadas. Los resultados dependen mucho de que el tiempo de expresión sea el apropiado. Este tiempo varía según el agente y según el órgano. Otro punto a tener en cuenta es el tratamiento pues se piensa que los tratamientos crónicos son más efectivos que los tratamientos agudos.

Conviviendo con mutágenos

Los mutágenos desde el punto de vista de su utilización por el hombre se pueden agrupar como productos industriales, pesticidas, fármacos y drogas y alimentos y aditivos de la alimentación:

Productos industriales. Incluyen una amplia gama de compuestos, tanto en lo referente a su estructura orgánica como a su aplicación industrial. La mayor parte de ellos son agentes alquilantes con diferentes grupos funcionales. Así, se encuentran las lactonas, aldehídos, aziridinas, mostazas, epóxidos, nitrosaminas y sulfatos dialquilicos.

Entre los más importantes, desde el punto de vista mutagénico, se pueden citar, a modo de ejemplo, los siguientes:

- Hidrocarburos aromáticos polinucleares: El 3,4-benzopireno es el agente carcinógeno más potente y extendido que contamina el aire como resultado de la combustión incompleta de combustibles sólidos, líquidos y gaseosos. Dicho compuesto se encuentra también en condensados de humo de tabaco, aceites minerales, ceras comerciales, polvo producido por el desgaste de las correas de caucho en su roce con las poleas, etc.
- Acetaldehído: utilizado como disolvente en las industrias del caucho, curtido de pieles y papel. Producto intermedio en los procesos de obtención de muchos productos químicos (ácido acético, alcohol butílico, acetato de celulosa, resinas de acetato de vinilo, etc.). Detectado también en el humo del tabaco y del automóvil. Mutágeno en *Drosophila*.
- Formaldehído: muy utilizado él o sus polímeros en la fabricación de resinas sintéticas y en la industria textil y del papel (también en la agricultura como desinfectante de semillas y fungicida). Detectado en el humo del tabaco y automóviles. Su mutagenicidad ha sido demostrada en *Drosophila*, *Neurospora* y *E. coli*.

- Acroleína: utilizado en el acabado textil, tratamiento del papel, gomas químicas, plásticos, resinas sintéticas e industria farmacéutica. Detectado en la hoja y humo del tabaco y en atmósferas de pinturas y barnices vegetales y humo de automóviles. Mutágeno en *Drosophila*.

Dentro de este apartado relacionado con los productos industriales es necesario hacer relación al denominado **riesgo ocupacional**. Existen datos experimentales realizados *in vivo* sobre personas que por su trabajo manejan o están en contacto con determinados productos químicos que demuestran un incremento de anomalías cromosómicas en análisis realizados normalmente en linfocitos de sangre periférica. Por ejemplo, según Ashby y Richardson (1985)⁴⁷, que analizaron varios grupos de riesgo ocupacional en más de 100 estudios citogenéticos realizados entre 1965 y 1984, hay una evidencia positiva de daños cromosómicos como consecuencia de la exposición a:

- Benceno (disolvente industrial utilizado también en la fabricación de otros compuestos químicos).
- Estireno (benceno de vinilo, utilizado como disolvente orgánico en la industria del plástico y resinas).
- Agentes alquilantes anticancerígenos (utilizados en la quimioterapia del cáncer, su manejo como aerosoles o el contacto directo de la piel con la droga o por la orina de los pacientes).
- Oxido de etileno (usada principalmente para fabricar **glicol de etileno** -una sustancia química usada como **anticongelante** y **poliéster**-. Una pequeña cantidad (menos de 1%) es usada para controlar **insectos** en ciertos productos agrícolas almacenados, y una cantidad muy pequeña se usa en **hospitales** para **esterilizar** equipo y abastecimientos médicos.

En un estudio realizado en 1975, Kilian y colaboradores [48] analizaron los efectos ocupacionales en 7.000 empleados de la Texas Division de la Dow Chemical USA que fabrican o manipulan, entre otros, los siguientes productos potencialmente tóxicos:

Benceno, etilenimina, cloruro de vinilo, cloruro de vinilideno, tricloroetileno, epíclorohidrina, diisocianato de tolueno, diamina de tolueno, fosgén, tetracloruro de carbono, cloroformo, hexaclorobenceno y hexaclorobutadieno.

En su estudio, Kilian hacen especial hincapié en los riesgos de exposición al cloruro de vinilo y al cloruro de polivinilo, mostrando que el riesgo ocupacional

es muy superior en el segundo caso, influyendo además, lógicamente, la dosis de exposición (ppm), la duración y la intensidad.

Por su parte, Beckman y colaboradores ^{49, 50} comprobaron el efecto de la exposición al arsénico de 39 trabajadores de una fundición de acero de Suecia, mostrando un aumento de frecuencia de roturas y aberraciones cromosómicas porque el arsénico impide la reparación del DNA. Los mismos autores estudiaron la frecuencia de abortos espontáneos ⁵¹ y peso al nacer ⁵² en la población que vivía en las proximidades de la misma planta de fundición de mineral antes citada, observando un aumento de la frecuencia de abortos y una disminución del peso al nacer, aunque con los datos obtenidos era difícil de evaluar realmente el efecto.

El riesgo ocupacional del contenido aromático del fuel como consecuencia de la exposición al benceno (1-5 %) fue analizado por Fredga y colaboradores ⁵³. La muestra estudiada consistió en el análisis citogenético de linfocitos de 65 personas que realizaban las actividades siguientes:

- Once conductores de camiones-cisterna de distribución de fuel
- Nueve tripulantes de barcos-cisterna
- Nueve empleados de gasolineras
- Doce conductores de camiones-cisterna de distribución de petróleo
- Doce conductores de camiones-cisterna de distribución de leche en la misma zona
- Doce trabajadores de la industria del gas expuestos al benceno en su actividad

Los resultados mostraron un moderado, pero estadísticamente significativo, aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en los conductores de camiones-cisterna y en los trabajadores industriales expuestos al benceno, pero no en los tripulantes de barcos-cisterna ni en el personal de las estaciones de servicio. El hecho de que los conductores de camiones distribuidores de fuel, petróleo y leche tuvieran una incidencia similar de aberraciones cromosómicas indica que éstas no son atribuibles en este caso al benceno.

Pesticidas. Este grupo incluye los herbicidas, fungicidas, insecticidas, acaricidas, esterilizantes de semillas, fumigantes y quimioesterilizantes. La distribución de estos productos se hace en forma de gránulos, polvo, espray, espuma o aerosol, de manera que el hombre está expuesto a los mismos, ya sea ingiriendo los residuos tóxicos, ya sea por contacto directo durante su manejo.

Los pesticidas orgánicos pueden ser metabolizados en los seres vivos y/o degradados ambientalmente por procesos fotolíticos, térmicos, etc. Evidentemente, el grado y naturaleza de la transformación que experimenten varía con el pesticida, la causa de modificación, etc. Algunos de ellos se transforman en minutos y otros duran años sin cambio alguno.

Se indica, a continuación, los nombres y utilización de diferentes pesticidas indicando el tipo de variación genética que producen:

- Captán: Fungicida. Teratógeno en embrión de pollo y mutágeno en *E. coli* y cultivos celulares *in vitro*.
- Aramite: Acaricida no sistémico. Carcinógeno en ratas y perros; mutágeno en *Drosophila*.
- DDT: El más efectivo y más barato de los insecticidas sintéticos. Ha mostrado su mutagenicidad en ratas y células humanas *in vitro*.
- DDVP: Insecticida, fumigante y helmíntico en veterinaria. Produce alteraciones cromosómicas en *Vicia faba* y mutágeno en *E. coli*.
- Hidracida maleica: herbicida, fungicida, inhibidor y regulador del crecimiento. Mutágeno en *Drosophila*, carcinógeno, produce inhibición mitótica y aberración cromosómica en plantas.
- Tepa, Metepa, Afolate y Tiotepa: Son aziridinas quimioesterilizantes de insectos (aparte de su uso en la industria textil, del papel y la madera). Sus propiedades mutagénicas se han demostrado en organismos animales y vegetales y en microorganismos.
- TEM: Quimioesterilizante de la mosca doméstica y de los frutales (usado también en la manufacturación de productos resinosos y en el acabado del rayón e impermeabilización del celofán). Mutágeno y productor de aberraciones cromosómicas en *Drosophila*, ratón, cultivos de leucocitos humanos, etc.
- Hemel y Hempa: Análogos no alquilantes de la tetramina y tepa, respectivamente. Quimioesterilizantes de la mosca doméstica. Ambos son mutágenos.
- Organomercuriales: Fungicidas y esterilizantes de semillas. Mutágenos y productores de anomalías cromosómicas.
- Epóxidos: Oxido de etileno y óxido de propileno. Fumigantes y esterilizadores gaseosos. Acción mutagénica en *Drosophila*, *Neurospora* y cebada, induciendo aberraciones cromosómicas en plantas.

Fármacos y drogas. Los fármacos que se ha demostrado que son capaces de inducir mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas se encuentran distribuidos en un amplio espectro, tanto respecto a su estructura química (agentes alquilantes, antibióticos, acridinas, etc.) como a su utilización terapéutica (antineoplásicos, antibacterianos, antipiréticos, sedativos, etc.). Algunos ejemplos son:

- Antibióticos: Los antibióticos derivados de la estreptomycina son inhibidores del DNA y utilizados como agentes antineoplásicos. Son mutágenos e inducen aberraciones cromosómicas. Entre ellos, están la mitomicina C, estreptonigrina, azaserina, fleomicina, etc.
- Agentes alquilantes: utilizados especialmente en la quimioterapia del cáncer. Entre ellos se pueden citar la ciclofosfamida, trenixnón, myleran, mostazas (nitrogenada, azufrada y oxigenada), tetramina, etc.
- Vinca-alcaloides: los alcaloides Vincristina y Vínblastina obtenidos de la planta *Vinca rosa* se utilizan como citostáticos en la terapia de la enfermedad de Hodgskin y el coriocarcinoma. Ambos alcaloides producen aberraciones cromosómicas en cultivos celulares animales y vegetales.
- Antagonistas del ácido fólico: la aminopterina y metrotexato se utilizan en la quimioterapia del cáncer y el daraprim como antimalarial.
- Derivados de la acridina: la acriflavina, la proflavina y la 5-aminoacridina se utilizan en medicina y veterinaria como agentes antisépticos y bactericidas. La quinacrina atabrina es un antimalarial de enorme poder mutagénico.
- Miscelánea: se enumeran, a continuación, diversos compuestos con indicación de su utilización terapéutica:
 - Hidroxiurea: antineoplásico, leucemia crónica y aguda.
 - Uretano: sedante, antiespasmódico, leucemia.
 - Ditranol: psoriasis y otras dermatosis crónicas.
 - Miracil D: esquistosomiasis.
 - Bromuro de etidio: tripanocida.
 - Hidrato de cloral: hipnótico y sedante.
 - 8-hidroxiquinoleína: antibacteriano y fungistato.
 - Fenil butazona: analgésico, antipirético y antiinflamatorio.
 - Medlicina: antináuseas y antihistamínico.
 - Negrama: bacteriostático del tracto urinario.

- Mertiolato: antiséptico tópico.
- LSD (dietilamida del ácido lisérgico): alucinógeno para el tratamiento experimental de enfermedades mentales.
- Colchicina: gota aguda y artritis sarcoide crónica.
- Peróxido de hidrógeno: antiséptico tópico, elixires, dentríficos, lociones sanitarias.
- Isiomiazida: antituberculosis.
- Clorpromazina: sedante y tranquilizante.
- Fenotiazinas: psiquiatría, náuseas y vómitos.

Alimentos y aditivos de la alimentación. Se indican a continuación algunos de los alimentos y aditivos de la alimentación que han mostrado tener efectos mutagénicos y/o cancerígenos.

- Cafeína: Se ingiere directamente en bebidas de tan amplia difusión como el café, el té y el mate, así como en las llamadas “bebidas blandas”, particularmente las “colas” elaboradas con el fruto del árbol *Cola acuminata*. Además, la cafeína es un componente muy utilizado en fármacos para combatir el mareo, analgésicos, estimulantes, vasodilatadores. Existe controversia respecto a su poder mutagénico, pues en unos organismos actúa con más intensidad que en otros.
- Sacarina: edulcorante que se utiliza como sustitutivo del azúcar. Ha resultado mutagénico en pruebas en pruebas *Salmonella*-microsomal.
- Isotiocianato de alilo: producto natural que se deriva de la sinigrina, glucosinolato muy común en plantas del género *Brassica* (coles) y *Sinapsis* (rábano, etc.). Aditivo de salsas picantes, aromáticas, mostazas sintéticas, etc. y conservador de carne. Es mutagénico y produce también alteraciones cromosómicas.
- Ciclamato y ciclohexilamina: de amplia utilización como edulcorantes. A raíz del descubrimiento de que los ciclamatos producían tumores de vejiga en ratas alimentadas con dichos aditivos, se prohibió su uso en muchos países. Antes de la prohibición el consumo previsto para 1970 era de unos 10 millones de kilos. En 1968 el 15 % de las “bebidas blandas” estaban edulcoradas con ciclamatos. Experimentalmente inducen roturas cromosómicas, tanto en células vegetales como animales y humanas. Actualmente, sin embargo, parece que han vuelto a ser autorizados.
- Hidrocarburos aromáticos polinucleares: el 3,4-benzopireno es el agente

carcinógeno más potente y extendido que contamina el aire como resultado de la combustión incompleta de combustibles sólidos, líquidos y gaseosos. Se ha encontrado en ahumados, galletas, margarina, mayonesa y naranja. Se ha demostrado su mutagenicidad en *Drosophila*, *E.coli* y ratón.

- Acido etilen-diamino-tetracético (EDTA): por su acción antioxidante se utiliza para conservación de alimentos que contienen grasas y aceites, tales como la mayonesa, margarina, ensalada, etc. Asimismo, mantienen el aroma y el color de los vegetales. Produce anomalías cromosómicas.
- Nitritos y ácido nitroso: el nitrito sódico es muy utilizado para conservar la carne, el pescado y el queso. El ácido nitroso es un poderoso mutágeno, actuando por desaminación de la adenina y la citosina.
- Bisulfito sódico: inhibidor bacteriano en la fabricación del vino y la cerveza. Se ha demostrado su acción mutagénica en virus y bacterias.
- Cicasin: se extrae del fruto, semilla y raíz de plantas del género *Cycas*, muy utilizadas como alimento y medicinas en zonas tropicales y subtropicales. La cicasina y su aglicona producen efectos carcinógenos, teratógenos y mutágenos.
- Alcaloides de pirrolizidina: presentes en especies de los géneros *Senecio*, *Crotolaria*, *Amsinkia*, etc. Son hepatotóxicas para el ganado y, al ser utilizadas como hierbas medicinales en zonas rurales de los trópicos y subtrópicos, se atribuye a tales alcaloides la alta incidencia de enfermedades hepáticas de dichas poblaciones humanas. Tienen acción mutagénica e inducen aberraciones cromosómicas en *Drosophila* y algunos vegetales.
- Patulina: es un antibiótico mutágeno y carcinógeno (lactona no saturada) producido por diversas especies de hongos (*Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*). Dado que estos hongos pueden contaminar ciertos alimentos, ello explicaría el que se haya detectado la presencia de patulina en la harina, manzana, jugos de frutas, etc.
- Aflatoxinas: metabolitos tóxicos producidos por algunas razas específicas de determinados hongos (por ejemplo, *Aspergillus flavus*, *Penicillium puberulum*) que pueden aparecer sobre determinados frutos secos (cacahuete) de alimentación humana y piensos para animales. Son carcinógenos poderosos.

Entre los productos alimenticios se ha encontrado en los alimentos ahumados, galletas, margarina, mayonesa y naranja, Se ha demostrado su mutagenicidad en *Drosophila*, *E. coli* y ratón.

Otro compuesto similar, el 1, 2, 5, 6-dibenzo-antraceno, encontrado en carne y pescados ahumados y en naranjas, es también mutágeno y carcinógeno.

Recomendaciones básicas. El tabaco, potenciado por el alcohol, y la dieta alimentaria son responsables de las dos terceras partes de las muertes causadas por los distintos tipos de cáncer. Estos son los mejores consejos para proteger nuestro DNA y evitar las mutaciones:

1. Evitar el **humo del tabaco**. El humo del tabaco que tragan los fumadores es un potente agente mutágeno, pero las dañinas nitrosaminas y benzopirenos se encuentran también en el humo que se expele, así que también los fumadores pasivos se ven afectados. Evitar fumar y frecuentar los lugares cerrados y mal ventilados.
2. Tomar el sol con moderación y siempre con cremas que contengan filtros solares. La radiación ultravioleta favorece la aparición de cánceres de piel.
3. No abusar de las **bebidas alcohólicas** pues están implicadas en el desarrollo del cáncer de esófago, estómago e hígado, además de potenciar los efectos del tabaco.
4. Limitar el consumo de **productos ahumados**. Contienen benzopirenos que son potentes cancerígenos. También se encuentran en las zonas quemadas o muy tostadas de la carne, el pescado o el pan.
5. Evita la utilización de **aceites sometidos a sucesivas frituras**. Contienen Trp-I, Trp-II, IQ y MeIQx que son sustancia mutágenas.
6. Consumir una gran variedad de **frutas y verduras**, aportan sustancias antioxidantes que eliminan los radicales libres y protegen al DNA de su acción mutágena, también contienen oligoelementos y multitud de sustancias (flavonoides, licopenos, antocianidinas, etc.) que activan los procesos de reparación del DNA.

Bibliografía

- BEALE, G. (1993). The Discovery of Mustard Gas Mutagenesis by Auerbach and Robson in 1941. *Genetics* 134 (2): 393–399.
- MULLER, H. J. (1927). Artificial Transmutation of the Gene. *Science* 66 (1699): 84–87.
- CROW, J. F.; Abrahamson, S. (1997). Seventy Years Ago: Mutation Becomes Experimental. *Genetics* 147 (4): 1491–1496.
- STADLER, L. J. (1928). Mutations in Barley Induced by X-Rays and Radium. *Science* 68 (1756): 186–187.
- STADLER, L. J.; Sprague, G. F. (1936). Genetic Effects of Ultra-Violet Radiation in Maize. I. Unfiltered Radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22 (10): 572–578.
- AUERBACH Ch., Robson, J. M., Carr, J. G. (1947) Chemical Production of Mutations, *Science* 105: 243-247.
- BROWN, J. R.; Thornton, J. L. (1957). Percivall Pott (1714-1788) and Chimney Sweepers' Cancer of the Scrotum. *British journal of industrial medicine* 14 (1): 68–70.
- YAMAGAWA K., Ichikawa K. (1915). Experimentelle Studie ueber die Pathogenese der Epithel geschwuelste. *Mitteilungen aus der medizinischen Fakultät der Kaiserlichen Universität zu Tokyo* 15: 295–344.
- LUCH A. (2005). Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 5 (2): 113-125.
- LENGAUER, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cáncer. *Nature* 396: 643-649.
- ORR-WEAVER, T. L., Weinberg, R. A. (1998). A checkpoint on the road to cáncer. *Nature* 392: 223-224.
- PONDER, B. A. (2001). Cancer genetics. *Nature* 441: 336-341.
- EPSTEIN, C. J. (1988). Mechanisms of the effects of aneuploidy in mammals. *Annual Review of Genetics* 22: 51-75.

- COHEN, J. (2002). Sorting out chromosome errors. *Science* 296: 2164-2166.
- PATTERSON, D. (1987). The causes of Down syndrome. *Scientific American* 257 (2): 52-60.
- LEJEUNE J., Lafourcade J., Berger R., Vialatte J., Boeswillwald M., Seringe P. Turpin R. (1963). 3 cases of partial deletion of the short arm of a 5 chromosome. *C. R. Hebd Seances Acad Sci.* 257: 3098-3102.
- RABBITS, T.H. (1994). Chromosomal translocations in humans cancers. *Nature* 372: 143-149.
- ROWLEY, J. D. (1998). The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annual Review of Genetics* 32: 495-519.
- SÁNCHEZ-GARCÍA, I. (1997). Consequences of chromosome abnormalities in tumor development. *Annual Review of Genetics* 31: 429-453.
- VERKERK, A. J., Pieretti, M., Sutcliffe J. S., Fu Y.-H., Kuhl D. P., Pizzuti A., Reiner O., Richards S., Victoria M. F., Zhang F. P., Eussen B. E., van Ommen G.-J., Blonden L. A., Riggins G. J., Chastain J. L., Kunst C. B., Galjaard H., Caskey C. T., Nelson D. L., Oostra B. A., Warren S. T. (1991). Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65 (5): 905-914.
- YU, S., Mulley, J. Loesch, D., Turner G., Donnelly, A. Gedeon, A., Hillen, D., Kremer, E., Lynch, M., Pritchard, M., Sunderland, G. R., Richards, R. I. (1992). Fragile-X syndrome: unique genetics of the heritable unstable element. *American Journal of Human Genetics* 50: 968-980.
- ASHLEY-KOCH, A. E., Robinson H., Glicksman A. E., Nolin S. L., Schwartz C. E., Brown W. T., Turner G., Sherman S. L. (1997). Examination of factors associated with instability of the FMR1 CGG repeat. *Am. J. Hum. Genet.* 63: 776-785.
- SINDEN, R. R. (1999). Biological implications of DNA structures associated with disease-causing triplet repeats. *American Journal of Human Genetics* 64: 346-353.
- GOODMAN, M. F. (1995). DNA models: mutations caught in the act. *Nature* 378: 237-238.
- CADENAS E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem.* 58: 79-110.
- COMPORTI M. (1989). Three models of free radical-induced cell injury. *Chem Biol Interact.* 72 (1-2): 1-56.
- PUEYO, C., Ariza, R. R. (1993). Role of reactive oxygen species in the mutagenicity of complex mixture of plant origin. En "DNA and free

- radicals”, U. Halliwell and O. I. Aruoma (eds.), Vol. 14, pp: 275-279, Ellis Horwood, Sacramento, London.
- BECKER, M. M., Wang, Z. (1989). Origin of ultraviolet damage in DNA. *J. Mol. Biol.* 210: 429-438.
- PIERCE, B. A. (2009). *Genética: un enfoque conceptual*. Editorial médica panamericana. Cap. 13, pp: 337-340.
- BEADLE G. W., Tatum E. L. (1941). Genetic control of biochemical reactions in neurospora. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27 (11): 499-506.
- NEEL, J. V., Satoh, C., Hamilton, H. B., Otake, M. Goriki, K., Kageoka, T., Fujita, M., Neriishi, S., Asawaka, J. (1980). Search for mutations affecting protein structure in children of atomic bomb survivors: preliminary report. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 77: 4221-4225.
- SCHULL, W. J., Otake, M., Neel, J. V. (1981). Genetic effects of the atomics bombs: a reappraisal. *Science* 213: 1220-1227.
- DUBROVA, Y. E., Nesterov, V. N., Krouchinsky, N. G., Ostapenko, V. A., Neumann, R., Neil, D. L., Jeffreys, A. J. (1996). Human minisatellite mutation rate after the Chernobyl accident. *Nature* 380: 683-686.
- RUSSEL W. L. (1951). X-ray-induced mutations in mice, *Quant. Biol.* 16: 327-336.
- AMES, B. N., McCann, J., Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31 (6): 347-364.
36. Ames B. N, Kammen H. O., Yamasaki E. (1975). Hair dyes are mutagenic: identification of a variety of mutagenic ingredients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72 (6): 2423-2427.
- GABRIDGE, M. G., Legator, M. S. (1969). A host-mediated microbial assay for the detection of mutagenic compounds. *Proc Soc Exp Biol Med.* 130 (3): 831-834.
- MALLING, H. V., De Serres, F. J. (1971). Hydroxylamine-induced purple adenine (ad-3) mutants in *Neurospora crassa*. I. Characterization of mutants by genetic tests. *Mutat Res.* 12 (1): 35-46.
- RUIZ-VÁZQUEZ, R., Pueyo, C., Cerdá-Olmedo, E. (1978). A mutagen assay detecting forward mutations in an arabinose-sensitive strain of *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* 54 (2): 121-129.
- MCCANN J, Choi E, Yamasaki E, Ames B. N. (1975). Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72 (12): 5135-5139.

- TANAKA, K., Wood, R. D. (1994). Xeroderma pigmentosum and nucleotide excision repair. *Trends in Biochemical Science* 19: 84-86.
- ASHBY J., Tennant R. W. (1988). Chemical structure, Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP. *Mutat Res.* 204 (1): 17-115.
- ASHBY J., Tennant R. W. (1994). Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. *Mutat Res.* 257(3): 229-306. Erratum in: *Mutat Res* 317 (2): 175.
- QUILLARDET, Ph., Huisman, O., D'ari, R., Hofnung, M. (1982) SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity. *Proc. NatL Acad. Sci.* 79: 5971-5975.
- BOMBARDIER, M., Bermingham, N., Legault, R., Fouquet, A. (2001). Evaluation of an SOS-Chromotest-based approach for the isolation and detection of sediment-associated genotoxins. *Chemosphere.* 42 (8): 931-944.
- KELLY, C. M., Latimer, J. J. (2004). Unscheduled DNA synthesis: a functional assay for global genomic nucleotide excision repair. *Molecular Toxicology Protocols* 291: 303-320.
- ASHBY J, Richardson C. R. (1985). Tabulation and assessment of 113 human surveillance cytogenetic studies conducted between 1965 and 1984. *Mutat Res.* 154 (2):111-33.
- KILIAN D. J., Picciano D. J., Jacobson C. B. (1975). Industrial monitoring: a cytogenetic approach. *Ann N Y Acad Sci.* 269: 4-11.
- BECKMAN G, Beckman L, Nordenson I.(1977). Chromosome aberrations in workers exposed to arsenic. *Environ Health Perspect.*19: 145-6.
- NORDENSON I, Beckman G, Beckman L, Nordström S. (1978). Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. II. Chromosomal aberrations in workers exposed to arsenic. *Hereditas* 88 (1): 47-50.
- NORDSTRÖM S, Beckman L, Nordenson I. (1978). Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. III. Frequencies of spontaneous abortion. *Hereditas.* 188 (1): 51-54.
- NORDSTRÖM S, Beckman L, Nordenson I.(1978). Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. I. Variations in birth weight. *Hereditas* 88(1): 43-46.
- FREDGA, K., Reitalu, J., Berlin, M. (1979). Chromosome studies in workers exposed to benzene. En "Genetic damage in man caused by environmental agents", K. Berg (ed.), pp:187-203, Academic Press, New York.

Fenómica

Julia María Lesher Gordillo, Raymundo Hernández Martínez,
Manuel Enrique Jiménez García, Alinne Audrei Martínez López.

Caracterización fenotípica a gran escala

El desarrollo de la genómica ha contribuido al avance de distintos campos de la ciencia como la medicina, farmacología, agricultura, entre otros; gracias al descubrimiento de secuencias de genes, los cuales son necesarios para la producción de proteínas de importancia médica y a la comparación de secuencias genómicas de distintos organismos.

En los últimos 15 años, se ha propuesto que la fenómica es el complemento natural de la secuencia del genoma como un rápido avance en biología. El Proyecto del Genoma Humano permitió dicho avance y el surgimiento considerado por varios autores de una nueva área: Fenómica. El Proyecto del Genoma Humano emergió en los años 80, con objetivos enfocados a que los genomas podrían acelerar en forma importante la investigación biomédica, permitiendo el enfrentamiento y posibles soluciones de los problemas en forma más racional ^{1,2}.

No obstante la proteómica, integra una amplia variedad de eventos post-transcripcionales y regulatorios; considerada como el siguiente paso en el estudio de un sistema biológico, luego de la genómica. Dicha ciencia se considera más difícil que el estudio de genomas ya que un proteoma difiere de una célula a otra y de un momento a otro, pero hoy en día es un elemento clave para los estudios y avances en medicina.

¿Qué es la fenómica?

El término “fenotipo” fue creado por Wilhelm Johannsen en 1911. El fenotipo es una propiedad observada en el organismo, como la morfología, el desarrollo, o el comportamiento. Debido a este elemento clave, la fenómica se define como el estudio de la naturaleza de los fenotipos y la forma en que se determinan.

Dicho estudio se lleva a cabo mediante la caracterización del fenoma, el cual se define como el conjunto de todos los fenotipos expresados por una célula, tejido, órgano, organismo, o especie.

La fenómica permite la adquisición de datos fenotípicos de un organismo a gran escala. Actualmente es necesario conocer y entender los datos fenotípicos, debido a que las variaciones genotípicas afectan los fenotipos, entender como un solo cambio genético afecta más de un fenotipo (pleiotropia), y obtener los datos que son necesarios para descifrar las causas de fenomas complejos³.

En el nivel superior de la caracterización fenotípica, la interacción entre genotipo y fenotipo a menudo ha sido conceptualizada mediante la siguiente relación:

$$\text{Genotipo} + \text{Ambiente} \rightarrow \text{Fenotipo}$$

Para entender estos fenómenos biológicos complejos, un sistema con enfoque biológico debe ser constituido donde el establecimiento de sistemas requiera una gran cantidad de información sobre entidades celulares, tales como la transcripción, proteínas y metabolitos^{4,5}.

Evidentemente esto será necesario para poder llevar a cabo estudios completos de asociación gen-ambiente-enfermedad y lograr avances en el conocimiento que impulsen la medicina personalizada. Sin embargo en muchos organismos, los fenotipos son muy diferentes en diversas condiciones ambientales

No obstante, para interpretar los datos fenotípicos, especialmente los múltiples niveles de organización, se necesita un marco conceptual fenómico. Afortunadamente este marco puede ser construido estableciendo datos de genética cuantitativa, biología evolutiva, epidemiología y fisiología³.

Herramienta clave para la caracterización fenotípica: La genómica

Actualmente el surgimiento y los avances en las caracterizaciones fenotípicas han ido de la mano de diversos proyectos enfocados al genoma de una variedad de organismos.

No obstante el Proyecto del Genoma Humano ha sido el punto de inicio para la fenómica, dicho proyecto comenzó en Estados Unidos el 1º de octubre de 1990. Sin embargo, el proceso para el inicio del proyecto ya había estado operando varios años antes. El Proyecto del Genoma Humano ha sido uno de los proyectos más importantes, para la investigación biomédica, permitiendo el

desarrollo de herramientas para el estudio de la biología y la medicina. Esta herramienta ha brindado información en la forma de mapas de secuenciación: físicos y genéticos del genoma, y de algunos organismos modelo. Siendo uno de los principales objetivos hoy en día alcanzados, el conocer la “huella genética humana” permitiendo definir mejores bases genéticas para una gran variedad de enfermedades y el uso de esa información para diseñar terapias más efectivas^{1,2}.

La medicina genómica surgió a partir de las áreas de genética epidemiológica y epidemiología molecular y puede definirse como la aplicación a las ciencias de la salud de los conocimientos originados a través del Proyecto del Genoma Humano.

El inicio de dicho proyecto, abrió las puertas de la genómica, como una ciencia de suma importancia para conocer y entender una variedad de procesos biológicos.

Actualmente cientos de genomas han sido secuenciados, algunos de ellos son mencionados a continuación:

En 1995 se conoció la primera secuencia completa y publicada de un genoma bacteriano y ahora se cuenta con más de 200 bacterias secuenciadas. Con todas estas secuencias de genomas se puede proporcionar claves útiles acerca de por qué algunas bacterias causan enfermedad en humanos, controlar su propagación, y tratar las infecciones causadas por ellos.

El primer genoma de plantas en ser secuenciado fue el de *Arabidopsis thaliana*, considerada como un organismo modelo, varias áreas dependen de organismos modelos para su avance. Un modelo ideal es económico, de fácil crecimiento, presenta facilidades para su cruce, y debe tener un ciclo de vida corto, para que los estudios puedan abarcar varias generaciones en semanas o meses. Destacando *Arabidopsis thaliana* la cual se adapta a estos criterios y se convirtió en los años 80 en el modelo de planta más conocido y actualmente el más utilizado.

No obstante debido a su posición evolutiva los peces cartilagosos proporcionan una referencia importante para nuestra comprensión de la evolución del genoma de vertebrados. El genoma relativamente pequeño del tiburón elefante (*Callorhynchus mili*), lo ha convertido en un atractivo modelo para la secuenciación de genomas completos de peces cartilagosos^{6,7}.

En el año 2009 se publicó uno de los genomas más esperados y de suma importancia médica: la secuenciación del genoma del ratón, había terminado. El ratón (*Mus musculus*) ocupa una posición singular en la genética y la genómica, es a la vez el modelo animal más utilizado para estudiar la evolución de las

enfermedades humanas. Los estudios llevados a cabo con ratones han permitido hacer avances en el tratamiento del cáncer, la diabetes, las enfermedades coronarias y muchas otras condiciones ⁸.

Las diferencias genéticas entre organismos ha sido estudiado mediante la genómica, la secuencia del genoma del chimpancé común (*Pan troglodytes*) ha permitido la comparación con el genoma humano, encontrando diferencias genéticas que se han acumulado desde que la especie humana y los chimpancés se separaron de nuestro ancestro común ⁹.

El carácter global de la información genómica ha generado enteramente nuevas disciplinas que utilizan la disponibilidad de la secuencia del genoma como punto de partida, siendo de suma importancia entender las características fenotípicas. A pesar de nuestra capacidad para caracterizar fenomas este va de la mano de la capacidad de caracterizar genomas.

Proyectos actuales de fenomas

Los esfuerzos para la caracterización de fenomas día a día va en aumento, sin embargo no hay un proyecto que se acerque a un fenoma completo, debido en parte a los costos y a la variedad de fenotipos; ya que estos son muy diferentes en diversas condiciones ambientales.

La fenómica ahora supera con creces el tiempo y los costos de la genómica. El desarrollo detallado de nuevos modelos ha provocado grandes costos, los cuales son necesarios para identificar los métodos más adecuados para hacer frente a los objetivos clave de la fenómica debido a que la recopilación de datos de alto rendimiento es prácticamente imposible con los métodos tradicionales de laboratorio ¹⁰.

Hoy día se conocen una parte considerada de fenomas de diversos organismos, en su mayoría disponibles en internet y en base de datos de fácil acceso. Proyectos que han mostrado avances significativos y brindan un mejor panorama a futuro para la caracterización fenotípica a gran escala. El acceso a dicha información ha permitido el avance de la fenómica, reforzando los conocimientos en diversas áreas y aplicaciones de la genética; a la vez que ha permitido el surgimiento de nuevos proyectos a futuros.

Algunos de los proyectos actuales son enlistados en la Tabla 1. Dichos proyectos han sido enfocados a organismos modelos u organismos utilizados en medicina. Como es el caso del fenoma del ratón, un proyecto de suma importancia para los avances en medicina; actualmente se encuentra disponible

The Mouse Phenome Database (MPD), European Mouse Phenotyping Resource of Standardised Screens (EMPRESS) y la European Mouse Disease Clinic (EUMODIC), consorcio para la detección fenotípica de líneas mutantes y líneas puras. El cual abarca la fisiología, morfología y comportamiento del ratón ³ (Tabla 1).

TABLA 1.
Proyectos actuales en el área de la fenómica

<i>Especies</i>	<i>Fundación</i>	<i>URL</i>
Ratón	The Mouse Phenome Database (MPD)	http://www.jax.org/phenome
	European Mouse Phenotyping Resource of Standardised Screens (EMPRESS)	http://www.empress.har.mrc.ac.uk
	European Mouse Disease Clinic (EUMODIC)	http://www.eumodic.org
Drosophila	Drosophila Population Genomics Project (DPGP)	http://www.dpgp.org
	Drosophila Genetic Reference Panel(DGRP)	http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/project-species-i-Drosophila_genRefPanel.hgsc http://flybase.org/static_pages/news/whitepapers/Drosophila_Genetic_Reference_Panel_Whitepaper.pdf
Plantas	International Plant Phenomics Network (IPPN)	http://www.plantphenomics.com http://www.plantphenomics.org.au
	Australian Plant Phenomics Facility (APPF)	http://www.fz-juelich.de/icg/icg-3/jppc
	Jülich Plant Phenotyping Centre (JPPC)	http://walnut.usc.edu/2010/GWA
	USC Nordborg Laboratory GWA studies in Arabidopsis thaliana	
Perro	Canine Phenome Project	http://www.caninephenome.org
Humana	Personal Genome Project	http://www.personalgenomes.org
	Consortium for Neuropsychiatric Phenomics (CNP)	http://www.phenomics.ucla.edu

Los fenómenos de organismos modelos, como es el caso de la mosca doméstica *Drosophila*, actualmente cuenta con el *Drosophila* Population Genomics Project (DPGP) y el *Drosophila* Genetic Reference Panel (DGRP) que han permitido el trabajo en el área de la fenómica para dicho organismo, presentando una variedad extensiva que incluye fisiología, resistencia a enfermedades, expresión de genes, comportamiento y morfología (Tabla 1).

La fenómica de plantas ha mostrado avances debido a la International Plant Phenomics Network (IPPN), el cual ha desarrollado e implementado la fenómica de taxas específicas con la colaboración de consorcios nacionales incluyendo el Australian Plant Phenomics Facility (APPF) y el Jülich Plant Phenotyping Centre (JPPC) (Tabla 1). Como producto del creciente interés en la fenómica, el APPF es un centro nacional, a disposición de todos los científicos de plantas de Australia, que ofrece acceso a la infraestructura que no está al alcance de los sectores públicos en cualquier parte del mundo. El APPF se basa en el análisis de imágenes automatizadas de las características fenotípicas de las colecciones de germoplasma, mapas y de poblaciones mutantes.

Entre algunas de las aplicaciones de dicho centro se pueden mencionar:

- Genómica funcional de especies modelos y de cultivos.
- Investigación en cambio climático.
- Desarrollo de nuevos productos para una alimentación sana.
- El mantenimiento de la biodiversidad y el desarrollo de nuevas estrategias para la recuperación de paisajes degradados.
- El uso de las plantas y bio-fábricas para producir nuevos productos farmacéuticos y otros productos para la industria.

Cabe resaltar que una de las especies modelos en plantas ha sido *Arabidopsis thaliana*, donde mediante la colaboración de grupos de trabajo con esta especie y la Genome-Wide Association (GWA) se realizan estudios a nivel fenotípico; de la mano de estudios de resistencia a patógenos, características de floración, entre otros (Tabla 1).

El Canine Phenome Project llevado a cabo por voluntarios científicos, veterinarios, propietarios de perros, criadores y entrenadores se ha enfocado a las enfermedades hereditarias con relevancia para la salud humana, el comportamiento y los defectos específicos de la raza (Tabla 1).

Finalmente las prospectivas en humanos son particularmente grandes, a pesar de los grandes desafíos para replicar genotipos o llevar a cabo muchos tipos de experimentos³. El Consortium for Neuropsychiatric Phenomics abarca

datos de genómica, estructura y función del cerebro, comportamiento en el estudio de casos y el control de tres los principales síndromes psiquiátricos. No obstante el Personal Genome Project tiene como objetivo reclutar voluntarios para la secuenciación del genoma y contar con datos para estudios fenotípicos.

Las demandas para la fenómica amplían los conocimientos en genética, biología molecular, biología celular, los sistemas biológicos y niveles de expresión fenotípica. Sin embargo los investigadores deben ser capaces de comunicarse eficazmente y colaborar en el diseño y ejecución de proyectos de investigación a gran escala ¹⁰.

La fenómica en medicina

Una de las principales metas de la investigación genética es poder identificar genotipos específicos asociados a fenotipos humanos y así entender, prevenir y tratar enfermedades. Hasta ahora las aproximaciones que se utilizan para definir y estudiar fenotipos no son suficientemente potentes para hacer uso de forma óptima de la información genómica disponible.

La biología de sistemas utiliza conjuntos de datos a gran escala para investigar las redes moleculares de señalización desde un punto de vista integral e integrador. Desde el surgimiento de la genómica y la proteómica, numerosos campos (por ejemplo, transcriptomas y metabolómica) han surgido, ayudando en la obtención de datos para la elaboración de bases de datos a gran escala¹¹ (Figura 1).

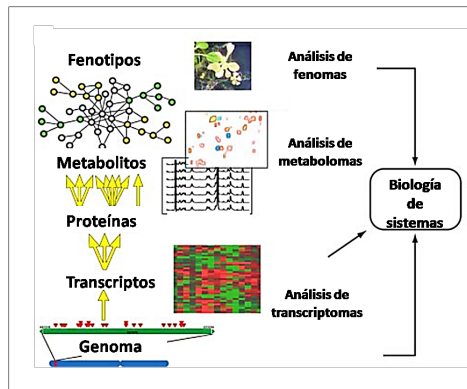


Figura 1. La biología de sistemas usa una combinación de análisis de fenómica, metabolómica y transcriptomas. Las flechas amarillas indican el flujo de la información genética, del genoma hacia el fenoma.

La caracterización fenotípica en los seres humanos es especialmente importante, el personal y el interés institucional en materia de salud llevan acabo la medición de los fenotipos de muchas personas durante el transcurso de sus vidas, como resultado de la atención médica o de los estudios a largo plazo. La gama de fenotipos humanos que ya se encuentran midiendo es extensa y la investigación es constante³.

Hay algunas características de los fenotipos que puede ser menos importante para avanzar en la investigación genética, pero puede ser priorizadas por su relevancia para otras aplicaciones en seres humanos. La investigación biomédica en última instancia, busca aliviar el sufrimiento humano, y por lo tanto los fenotipos pueden ser significativamente relacionados con la eficacia clínica y los resultados de los tratamientos, pueden ser objetivos importantes para el estudio.

El objetivo principal de la investigación genética es identificar genotipos específicos que se asocian con fenotipos humanos. En el año 2003, Freimery and Sabatti propusieron un esfuerzo internacional para crear bases de datos fenómicos, es decir, un conjunto integral de información fenotípica, y desarrollar nuevos enfoques para el análisis de tales datos fenotípicos. Llamando a este esfuerzo El Proyecto del Fenoma Humano¹². La complejidad del Proyecto haría necesaria la participación de entidades junto con industrias privadas farmacéuticas y biotecnológicas.

No obstante, la identificación de los denominados fenotipos intermedios o “endofenotipos” ayudará a determinar y diagnosticar más objetivamente una enfermedad, reorientará la investigación genética y permitirá desarrollar nuevos agentes farmacológicos.

Los trastornos psiquiátricos como la depresión, la ansiedad y la esquizofrenia son enfermedades generalizadas y devastadoras, por lo que se necesita mejorar los medicamentos y drogas psiquiátricas. Sin embargo el descubrimiento de enfermedades, trastornos psiquiátricos y trastornos del sistema nervioso central sistema (SNC) han sido menores que para otras áreas terapéuticas. La mayoría de los medicamentos psiquiátricos fueron descubiertos debido a observaciones casuales de los fenotipos de conducta en los seres humanos, roedores y otros mamíferos. Sin embargo, los análisis de químicos a gran escala en los mamíferos son ineficientes y poco práctico. En cambio, en el pez cebra han sido adecuados para el descubrimiento de drogas de alto rendimiento basada en el comportamiento. La gran cantidad de datos generados del comportamiento a gran escala del pez cebra facilitará la información de cómo los productos químicos afectan el comportamiento. Por lo tanto, los análisis

químicos basados en el comportamiento en el pez cebra pueden mejorar nuestra comprensión de la neurobiología y acelerar el ritmo para el descubrimiento de fármacos psiquiátricos ¹¹.

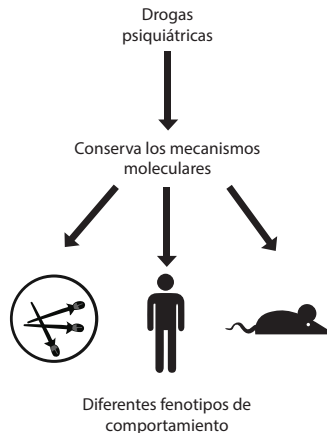


Figura 2. Las drogas psiquiátricas pueden alterar los fenotipos de comportamiento. Las drogas permiten medir diferentes fenotipos de comportamiento en una variedad de organismos.

Los fármacos actúan sobre muy conservadas dianas moleculares que afectan a la señalización neuronal, y los comportamientos en otras especies se pueden utilizar para identificar productos químicos con posibles propiedades psicoactivas en los seres humanos ¹¹(Figura 2).

El Framingham Heart Study investiga los factores de riesgo cardiovasculares entre los individuos sanos.

Desde 1948, los investigadores han recogido datos sobre cientos de rasgos en más de 14.000 personas de tres generaciones. Los rasgos cubren muchas de las clases fenotípicas como: el medio ambiente, la historia clínica y las causas de mortalidad¹³. El Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CARGO) ha obtenido importantes conocimientos sobre la arquitectura genética de la salud cardiovascular y el envejecimiento utilizando datos del Framingham Heart Study, así como de otros estudios³.

No obstante los estudios de la GWA han permitido que la investigación genética se encuentre enfocada en los síndromes neuropsiquiátricos, donde los investigadores se enfrentan a la complejidad en una escala sin precedentes. Sin embargo varios proyectos han iniciado el desarrollo de ontologías cognitivas: el Consortium for Neuropsychiatric Phenomics permitirá una colaboración más eficaz, y facilitara las conexiones de información sobre fenotipos cognitivos a otros niveles de conocimiento biológico¹⁴.



Figura 3. Esquema que ilustra los siete niveles de la hipótesis “genoma–síndrome”. Un esquema muy utilizado para la investigación neuropsiquiátrica en humanos.

En el Consortium for Neuropsychiatric Phenomics han utilizado un simple esquema para la investigación neuropsiquiátrica del genoma y su relación con los síndromes, en siete niveles¹⁴ (Figura 3).

Si bien los expertos que representan una perspectiva disciplinaria específica pueden argumentar con coherencia acerca de la validez de estos “niveles”, los cuales se han encontrado útiles para fomentar la comunicación interdisciplinaria¹⁰.

Cabe resaltar que varias aplicaciones en la web ya están disponibles para apoyar la exploración y contribuir en la generación de datos fenotípicos: PharmGKB (Tabla 2) fue creada por la Universidad de Stanford como proyecto de investigación en colaboración con el National Institute of Health (NIH), siendo accesible gratuitamente por Internet. El propósito de PharmGKB es relacionar la información genética, información fenotípica molecular y celular e información fenotípica clínica para proveer la infraestructura necesaria para entender cómo variaciones en el genoma de un individuo producen variaciones en la respuesta del mismo a un fármaco.

TABLA 2.
Aplicaciones web desarrolladas para el avance en
Las investigaciones fenómicas

<i>Herramientas</i>	<i>URL</i>	<i>Descripción</i>
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed	Ha sido desarrollado por la National Center for Biotechnology Information (NCBI) en la National Library of Medicine (NLM) de Estados Unidos. PubMed permite el acceso a las bases de datos compiladas por la NLM, como son MEDLINE, PreMEDLINE (compuesta por citas enviadas por los editores), Genbak y Complete Genoma.
PharmGKB	http://www.pharmgkb.org	Recopila, codifica y difunde el conocimiento sobre el impacto de variaciones genéticas humanas en respuesta a los fármacos.
PubGraph	http://www.pubgraph.org	Crea gráficas de los resultados de la consulta en PubMed, donde los nodos son conceptos definidos por cada consulta y los bordes están anotados con las estadísticas de la asociación.
PubAtlas	http://www.pubatlas.org	Genera estadísticas de co-ocurrencia entre las consultas de PubMed, genera mapas de calor y proporciona léxicos predefinidos relevantes para la investigación en fenómica neuropsiquiátrica .
Phenowiki	http://www.phenowiki.org	Proporciona texto Wiki-como la anotación de conceptos cognitivos y las pruebas, y la entrada de la base de datos de colaboración entre el tamaño del efecto cuantitativo, heredabilidad, psicométricas y estadísticas de la muestra.

No obstante también se encuentran algunas herramientas disponibles gratuitamente en línea para desarrollar avances en la fenómica neuropsiquiátrica (Tabla 2). PubGraph fue desarrollado para generar redes gráficas donde los nodos en los gráficos son conceptos definidos por las consultas de PubMed. PubAtlas ha desarrollado la consulta de instalación para generar mapas, trazar

o reproducir películas, permitiendo a los investigadores visualizar el crecimiento dinámico de las relaciones con el tiempo. PubAtlas contiene además una serie de léxicos predefinidos organizado en una serie de consultas en PubMed. Y Phenowiki fue desarrollado para permitir la anotación cuantitativa de conceptos de fenotipos cognitivos¹⁰ (Tabla 2).

Genética cuantitativa asociada a la interacción del genoma y el ambiente

La naturaleza de las características continuas

Aislando fenotipos mutantes y después cruzando y comparando mutantes con los fenotipos silvestres, Mendel fue capaz de describir las leyes básicas de la herencia. Posteriormente los genetistas han ampliado nuestra comprensión con base en los estudios moleculares de fenotipos mutantes. Los mutantes usados en estos estudios presentan fenotipos con características que los distinguen de la población. El recubrimiento de las semillas de los chicharos puede ser gris o blanca, las semillas pueden ser verdes o amarillas, y las plantas pueden ser altas o bajas. En cada característica, los fenotipos son marcadamente diferentes, y cada fenotipo puede ser fácilmente separado de los otros fenotipos. Estas características, con solo unos pocos fenotipos distintivos, son llamadas **características discontinuas**.

Para las características discontinuas, normalmente existe una relación simple entre el genotipo y el fenotipo. En la mayoría de los casos, los efectos de las variaciones en los alelos en un simple *locus* pueden ser observados a nivel del organismo, por lo que el fenotipo puede ser usado como un ejemplo del genotipo.

Cuando se presenta dominancia, el mismo fenotipo puede ser producto de dos genotipos; pero la relación entre genes y los genes y las características permanecen siendo simples. Sin embargo existen relaciones entre fenotipo y genotipo que no son tan sencillas: variable **penetrancia y expresividad**, así como **pleiotropia y epistasis**, son un ejemplo de relaciones complejas entre fenotipo y genotipo. Además un simple genotipo puede dar lugar a varios fenotipos debido a la interacción con el medio ambiente durante el desarrollo, a esto se le conoce como **norma de reacción**.¹⁵

Muchas características, como peso del humano al nacer y peso del adulto, contenido de proteínas en el maíz, y número de huevecillos ovipositados por *Drosophila*, presentan un amplio rango de fenotipos. Características como

estas, con una distribución continua de fenotipos son llamadas Características continuas.

Debido a que los fenotipos de características continuas pueden ser descritos por medidas cuantitativas, estas características también se conocen como **Características Cuantitativas**, y el área de la **Genética Cuantitativa** estudia la herencia de estas características.

Aspectos estudiados en la genética cuantitativa

Existen una gran cantidad de variaciones genéticas entre individuos. La cantidad de variación y como está distribuida determina la estructura de la genética de la población. La estructura fenotípica de una población, así como la relación entre la estructura genética y la estructura fenotípica, es estudiada por la genética cuantitativa, la cual tiene un papel muy importante para conocer la evolución, conservación y las características complejas.

La genética cuantitativa es especialmente importante en la agricultura, en donde esta es aplicada para medir las características de un cultivo, peso del grano, producción de leche, contenido graso etc. En psicología, la genética cuantitativa es usada para estudiar el CI (Coeficiente intelectual), capacidad de aprendizaje, y personalidad. Los genetistas humanos también aplican estos métodos para estudiar características como presión sanguínea, patrón de las huellas digitales, peso al momento del nacimiento etc.^{16, 17, 18}

En la transferencia genética, frecuentemente se determina la probabilidad de heredar un fenotipo en particular. Con las características cuantitativas, sin embargo, los individuos difieren en la cantidad de una característica, por lo que no tiene sentido preguntar por la probabilidad de heredar una característica continua, como en una característica discontinua. Los siguientes ejemplos son aspectos estudiados por los genetistas cuantitativos.

1. ¿Cuál es el grado de variación fenotípica observada producto de diferencias en el genotipo, y cuál es el grado de esta variación que refleja la influencia de diferentes ambientes? Al estudiar características discontinuas, estos cuestionamientos presentan poca importancia porque se asume que cualquier diferencia en el fenotipo es producto de una diferencia en el genotipo.
2. ¿Cuántos genes determinan el fenotipo? Cuando únicamente unos pocos *loci* están involucrados y la característica es discontinua, el número de *loci* puede ser determinado examinando la proporción de los fenotipos en

cruzas genéticos. En las características continuas, sin embargo, determinar el número de *loci* involucrados es más complejo.

3. ¿Por qué algunos genes tienen mayor influencia sobre una característica y otros modifican el fenotipo ligeramente?
4. ¿Los efectos de un alelo son añadidos? ¿En qué grado un alelo de diferente *loci* interactúa con otro?
5. ¿Cuándo la selección favorece un fenotipo particular, como puede cambiar una característica rápidamente? ¿Existen otras características que cambien al mismo tiempo?
6. ¿Cuál es el mejor método para seleccionar y cruzar individuos para producir los fenotipos deseables en la descendencia?

La herencia en las características continuas

Durante el siglo XIX, los biólogos iniciaron el desarrollo de técnicas para el estudio de características continuas, incluso antes de que se generalizaran los principios de Mendel. Francis Galton y su colaborador Karl Pearson demostraron que los fenotipos de los padres están asociados estadísticamente a su descendencia y que muchas características en humanos, como altura, peso, y características cognoscitivas, son heredadas de padres a hijos. De estos resultados, ellos fueron capaces de inferir que estas pueden ser heredadas, pero no fueron exitosos en determinar como ocurre esta heredabilidad.

Hipótesis poligénica de la herencia cuantitativa

Una característica puede tener un rango de fenotipos cuando los factores ambientales afectan la característica. Cuando los factores ambientales ejercen influencia, el mismo genotipo puede producir un rango de fenotipos (la norma de reacción), o varios genotipos pueden producir un mismo fenotipo. El fenotipo expresado va a depender tanto del genotipo y del ambiente específico en donde este genotipo se encuentra. En 1903, Wilhelm Johannsen publicó un estudio demostrando que la variación cuantitativa en el peso de las semillas de frijol se debía tanto a determinantes genéticos como ambientales. Este estudio fue un paso importante para en el reconocimiento de que tanto el ambiente como el genotipo influyen algunas características cuantitativas; estas características son referidas como **Características multifactoriales**. Debido a que la herencia de una característica cuantitativa no puede ser explicada por un *locus* sencillo, la

explicación alternativa es que son controlados por varios genes. Esta explicación es llamada **la Hipótesis poligénica o multigénica de la herencia cuantitativa**.¹⁹

Hipótesis poligénica para el color de la semilla del trigo

La hipótesis poligénica se inició en 1909 con el trabajo clásico de Hermann Nilsson-Ehle, el cual estudió el color de los granos del trigo. Al igual que Mendel, Nilsson-Ehle inició cruzando líneas puras de plantas con granos de trigo rojos y líneas de semillas de trigo blancas. La F1 de estos granos presentó un color intermedio entre rojo y blanco. Cuando Nilsson-Ehle cruzó nuevamente estos granos de F1, la progenie obtenida fueron blancas y varios tonos de rojo, en una proporción de aproximadamente 15 rojos (de todos los tonos):1 grano blanco. Lo cual es una desviación de la proporción de 3:1 para cruza monohíbrida. Además se presentaron 4 tonos de rojo entre la descendencia. Cuando se contó el número relativo de cada tipo, se encontró la siguiente proporción de fenotipos 1:4:6:4:1 correspondientes a rojo intenso, rojo medio, rojo intermedio, rojo ligero y blanco.²⁰

¿Cómo pueden interpretarse estos datos en términos genéticos?

La proporción 15:1 de dos características alternativas (rojo y blanco) resultaron de la interacción del producto de dos genes que afectan la misma característica. Hacemos la hipótesis que dos *loci* segregados independientemente controlan la producción del pigmento: el *locus* rojo con los alelos R y r, y el *locus* carmesí con los alelos C y c. Los cruces parentales de los genotipos F1 se muestran a continuación:

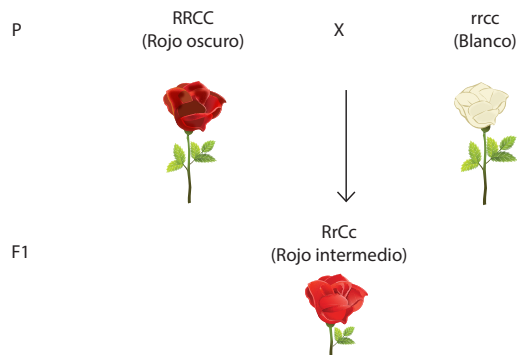


Figura 4. Comportamiento de la interacción genética.

Cuando la F1 es entrecruzada, la distribución de genotipos en el F2 es típica de una herencia dihibrida, que es $\frac{1}{16}$ RR CC + $\frac{2}{16}$ Rr CC + $\frac{1}{16}$ rr CC + $\frac{2}{16}$ RR Cc + $\frac{4}{16}$ Rr Cc + $\frac{2}{16}$ rr Cc + $\frac{2}{16}$ RR cc + $\frac{1}{16}$ rr cc + $\frac{1}{16}$ RR cc. Si R y C tiene una relación dominante sencilla sobre r y c, la proporción de fenotipos característico 9:3:3:1 de híbridos puede presentarse. En el caso del color de las semillas de trigo, la dominancia no es la respuesta porque los fenotipos observados presentan 5 tipos y presentan una proporción aproximada a 1:4:6:4:1.

Una explicación alternativa es que los alelos están clasificados según su funcionalidad (**alelos contribuyentes**) o no funcionales (**alelos no contribuyentes**) en la producción de pigmentación, y cada alelo contribuyente permite la síntesis (añadir) cierta cantidad de pigmento. Bajo esta hipótesis, la intensidad en la pigmentación de la semilla está en función al número de alelos R y C en el genotipo: RR CC serán rojo oscuro y rr cc serán blancos.

Nilsson-Ehle concluyó que la herencia en el color del trigo es un ejemplo de una serie poligénica de dos *loci* los cuales pueden contribuir con 4 alelos.

La hipótesis multigénica en el color del trigo es un buen ejemplo que puede ser aplicado a otros ejemplos de herencia cuantitativa. Con base en esto, la hipótesis de múltiples genes, propone que la herencia cuantitativa puede ser explicada por la acción y segregación de pares de alelos para un número de *loci*, llamados poli génicos, cada uno con un pequeño efecto sobre el fenotipo. (tabla 3)

Tabla 3.			
Genética de la explicación del número y proporción de F ₂ Fenotipos para el núcleo de color rojo; rasgos cuantitativos en trigo			
<i>Genotipo</i>	<i>Número de contribuyentes alelos para rojo</i>	<i>Fenotipo</i>	<i>Fracción de F₂</i>
RR CC	4	Rojo oscuro	1/16
RR Cc / Rr CC	3	Rojo medio	4/16
RR cc / rr CC / RR cC	2	Rojo intermedio	6/16
rr Cc / Rr cc	1	Rojo	4/16
Rr cc	0	Blanco	1/16

Herramientas estadísticas

Cuando múltiples genes y factores ambientales influyen una característica, la relación entre *loci* individuales y su contribución en el fenotipo puede ser compleja. Las mismas reglas de transmisión genética y función de los genes

son aplicables, pero definir el efecto de un simple *locus* requiere habilidad para determinar el genotipo de muchos individuos por *loci* en todo el genoma. Por lo cual los genetistas cuantitativos aplican procedimientos estadísticos y analíticos para comprender la influencia total de los genes en características continuas.

Un aspecto fundamental en el estudio de las características cuantitativas es que tanto la variación que existe entre los individuos de una población es genéticamente determinada y que tanto es ambientalmente inducida. Estos aspectos son importantes porque en muchas situaciones la comprensión de la contribución de ambos factores es necesaria para tomar decisiones. Por ejemplo, en algunos casos puede ser importante identificar líneas superiores de trigo (genotipos), y juntar estos al tipo de suelo (ambientales). Esta es la base de la genética cuantitativa, se puede traducir en la influencia de la naturaleza contra la crianza, o el papel relativo de los genes contra el ambiente en la formación de patrones de variación fenotípica. En términos de genética cuantitativa, puede verse el problema en términos de variación de estas dos fuentes: Que tanto la variación de algunos aspectos del fenotipo (V_p) son producto de la variación genética (V_G) y cuanto de la variación ambiental (V_E); esta relación se expresa como:

$$V_p = V_G + V_E$$

Para trabajar esta ecuación se debe de conocer cómo medir la variación en el fenotipo y como la partición de la variación en los componentes genéticos y ambientales. Para hacer esto, es necesario comprender la metodología estadística desarrollada específicamente para tratar con la genética cuantitativa.²¹

Muestras y poblaciones

Si queremos explicar algunos aspectos de una característica para un gran grupo de individuos, por ejemplo, el peso de los niños nacidos en una ciudad durante 1987. Una forma de contestar esta pregunta es coleccionar el peso de cada uno de los bebés nacidos en 1987. Un método alternativo, el cual es menos complicado, es coleccionar estos datos como un subgrupo del total y con ello estimar el peso de la población total. Los científicos comúnmente usan el muestreo como un procedimiento para la obtención de información. El grupo de interés es llamado **población**, y el subgrupo es llamado **muestra**. Para que una muestra de confiabilidad a nuestros resultados, debe de ser suficientemente grande para tener un sesgo en los resultados. La muestra también debe ser un subgrupo al azar de la población. Por ejemplo si todas las muestras se toman en un mismo

sitio puede haber factores que influyan sobre ese sitio que no se presenten en otro, no siendo esta muestra representativa de la población total. Aunque parezca obvio muchos errores de muestreo se producen porque la muestra no es representativa de toda la población.

Distribuciones

El sumar todos los fenotipos de una característica continua es una frecuencia de distribución, la cual es un resumen de un grupo en términos de proporción de individuos que se encuentran dentro de un cierto rango de fenotipos.

Para hacer una distribución de frecuencias, primero se debe de especificar el rango de los fenotipos a evaluar, y el número de individuos de cada clase debe ser contado o estimado. La frecuencia de datos debe ser representada gráficamente en un histograma de frecuencias. En el histograma, las clases de fenotipos se indican en el eje horizontal, y el número obtenido de cada clase se coloca en el eje vertical.

Existen ciertas formas de distribución de frecuencias que corresponden como se conoce matemáticamente a la probabilidad de distribución. Este tipo de distribución es llamada **distribución normal**. (Figura 5) Los datos que conforman la distribución normal pueden ser descritos con exactitud por pruebas estadísticas, como la media y la varianza, las cuales se describen a continuación.^{22, 23}

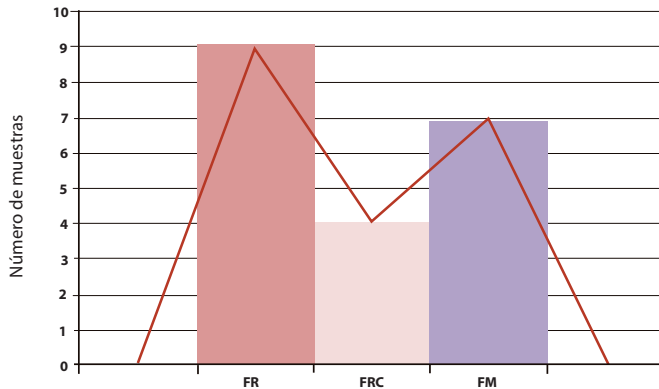


Figura 5. Histograma de tres fenotipos de *Chrysobalanus icaco* L .

Medida de tendencia central, la media

La distribución de frecuencias de una característica fenotípica distribuida normalmente puede ser resumida por dos valores estadísticos, la media y la varianza. La media muestral (\bar{x}), también conocida como promedio, la cual indica en donde se encuentra el centro de la distribución de los fenotipos de una muestra. Esta media de la muestra es calculada por una sumatoria simple de todos los individuos evaluados ($X_1, X_2, X_3 \dots X_n$) y dividida entre el total de individuos evaluados (n).

La media es un valor estadístico usado frecuentemente en genética cuantitativa para caracterizar los fenotipos de un grupo de individuos.^{22,23}

Medidas de dispersión. La varianza y desviación estándar

Una medida de tendencia central como la media, sólo proporciona un resumen parcial de la información de un conjunto de datos; la media como otras medidas de tendencia central, no proporciona información sobre la variación. Por lo que la **varianza** proporciona información sobre la variación y distribución de un fenotipo. Esta es una medida de cuanto las observaciones individuales se dispersan alrededor de la media. Dos distribuciones pueden tener la misma media, pero presentar diferentes varianzas. (Figura 6)

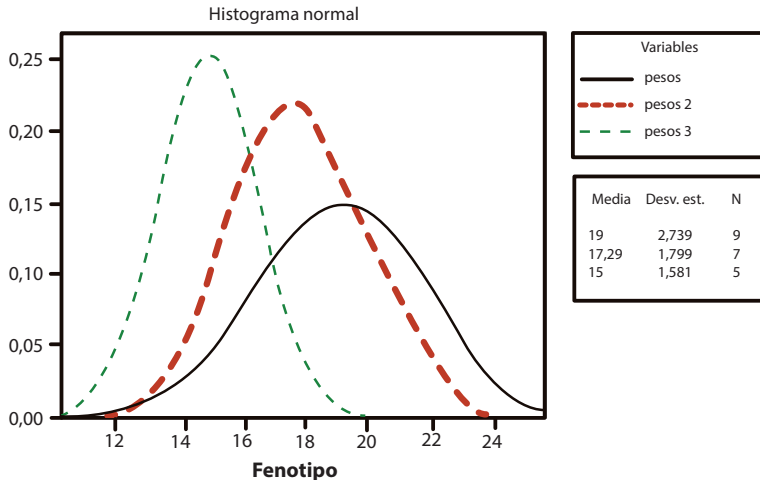


Figura 6. Distribución de frecuencias de tres fenotipos de *Chrysobalanus icaco* L.

Una curva ancha implica alta variabilidad y corresponde a una varianza elevada. Una curva estrecha, en contraste indica poca variabilidad y corresponderá a una varianza pequeña. La varianza es representada por dos símbolos σ^2 para la población y s^2 para la muestra. La varianza muestral es definida como el cuadrado de la desviación estándar.

$$\text{Varianza} = s^2 = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}$$

En ocasiones se prefiere usar la desviación estándar sobre la varianza porque la desviación estándar comparte las mismas unidades que las medidas originales (mientras que la varianza esta en unidades cuadráticas) La desviación estándar para una muestra es sencillamente la raíz cuadrada de la varianza muestral:

$$\text{Desviación estándar} = S = \sqrt{s^2}$$

Una distribución teóricamente normal es completamente especificada por la media y la desviación estándar.

La varianza y la desviación estándar proporcionan información valiosa sobre los fenotipos de un grupo de individuos. (Figura 7)

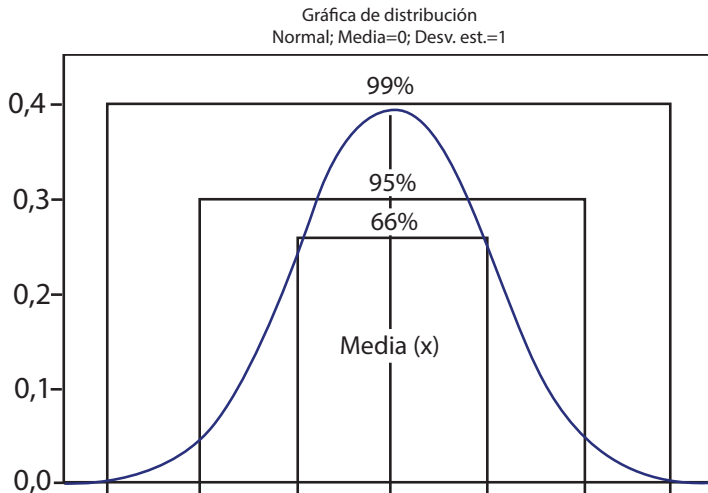


Figura 7. Distribución normal del fenotipo morado de *Chrysobalanus icaco* L 1,2 y 3 desviación estándar.

Correlación

Una dificultad encontrada cuando se piensa en todos los fenotipos de un organismo es que pueden presentarse artificios o picos de algunas características y estudiar estas en forma aislada. Los organismos están compuestos de muchas características, algunas de estas características como altura y peso, pueden agruparse en una característica más general llamada talla. Por lo cual es razonable pensar que los genes y los factores ambientales que afectan el desarrollo pueden tener efectos pleiotropicos afectando tanto al peso como a la altura. En otras palabras, los valores de dos o más características están frecuentemente correlacionados, lo que significa que si una variable cambia, la otra cambia también. Por ejemplo en humanos y en la mayoría de los animales, la longitud de los brazos y las piernas están correlacionados: los individuos con brazos largos normalmente tienen las piernas largas y viceversa.

El coeficiente de correlación es el valor estadístico que mide qué tan estrecha es una asociación entre dos variables en la misma unidad experimental. Si suponemos dos variables, longitud de brazos y longitud de las piernas, donde x es igual a la longitud de los brazos y y es igual a la longitud de las piernas. Para calcular la correlación entre estas dos variables, se inicia obteniendo la covarianza de x y y , las cuales se miden como la variación que es compartida por un individuo con las dos características. (Tabla 4) (158)

El coeficiente de correlación r puede ser obtenido dividiendo la covarianza de la desviación estándar de x y y .

$$\text{Coeficiente de correlación } = r = \frac{Cov_{xy}}{S_x S_y}$$

En donde S_x es igual a la desviación estándar de x , y S_y es igual a la desviación estándar de y .^{22,23}

Tabla 4.
Tabla de correlación de peso y longitud de granos de arroz.

Xi	Longitud		Ancho				YiXi	
	X_i	\bar{X}	$(X_i - \bar{X})_2$	Y_i	(mm)	$(Y_i - \bar{Y})_2$		
45	-13.91	193.48	18	-0.33	0.10	810		
56	-2.91	8.46	20	1.67	2.78	1120		
32	-26.91	724.14	21	2.67	7.12	672		
34	-24.91	620.50	23	-4.67	2180.89	782		
25	-33.91	1149.88	22	3.67	13.46	550		
67	8.09	65.44	14	4.33	18.74	938		
45	-13.91	193.48	15	-3.33	11.08	675		
89	30.09	905.40	19	0.67	0.44	1691		
67	8.09	65.44	13	-5.33	28.40	871		
71	12.09	146.16	22	3.67	13.46	1562		
87	28.09	789.04	17	-1.33	1.76	1479		
89	30.09	905.40	16	-2.33	5.42	1424		
$\sum X_i = 707.00$			$\sum (X_i - \bar{X})_2 = 5,766.82$			$\sum Y_i = 220.00$		$\sum (Y_i - \bar{Y})_2 = 2,283.65$

Regresión

El coeficiente de correlación nos indica que tan estrecha es una asociación entre variables e indica si la relación es positiva o negativa, pero no que tan es tan precisa cuantitativamente. Por ejemplo, si conocemos la correlación entre la altura de los padres e hijos, podremos cuestionarnos ¿si el padre mide 1.80 m cual será la altura del hijo?, para contestar este tipo de preguntas se usa el **análisis de regresión**.

La relación entre dos variables puede ser expresada en forma de una línea de regresión. Cada punto de la gráfica representará los valores para cada característica.

La línea de regresión está representada con la siguiente ecuación

$$y = a + bx$$

Donde x y y representan los valores de las dos variables, b representa la pendiente de la línea, también llamado coeficiente de regresión, y a es la intersección con y . La pendiente puede ser calculada a partir de la covarianza de x y y y de la varianza de x usando la siguiente fórmula:

$$\text{Pendiente} = b = \frac{Cov_{xy}}{Sx_2}$$

La pendiente indica que tanto un incremento en la variable sobre el eje de las y está asociado con el incremento de una unidad en el eje de las x . El análisis de regresión es comúnmente usado como método para medir que tanto la variación de una característica está determinada genéticamente.

Análisis de varianza

Una última técnica estadística es el análisis de varianza (ANOVA). El análisis de varianza es una herramienta poderosa para determinar si las diferencias entre las medias son significantes. Por ejemplo, si estamos interesados en conocer como los machos el cariotipo XYY y la altura promedio con un cariotipo normal XY. Se procedería primero a calcular la altura promedio de una muestra de machos XYY y la altura promedio de una muestra de machos XY. Suponiendo que encontramos que la altura promedio de la muestra de machos XYY fue

de 1.9 m y los machos XY es de 1.78 m. Las alturas promedio son diferentes para cada cariotipo y la ANOVA nos proporcionará la probabilidad de que la diferencia entre las dos medias sea al azar. Este análisis podría indicar que hay menos de 1% de probabilidad de que la diferencia entre las medias sea al azar y probablemente se llegaría a la conclusión de que la diferencia entre las alturas promedio de los cariotipos XYY y XY no se debe a un error de muestreo., sino producto de algún factor asociado con la diferencia en el cariotipo.

Para comprender la influencia genética sobre un rasgo o característica como la altura, la ANOVA puede ser usada para determinar que tanto la variación en altura está asociada con la diferencia en cariotipo. Si colectamos datos adicionales sobre dieta, ejercicio, y otras diferencias genéticas, y así sucesivamente, encontraremos que la diferencia en cariotipo está asociada con el 40% de la variación total en la altura entre individuos en muestras. Otros factores diferentes al número de cromosomas, como dieta, cuidado de la salud, etc., estarían asociados al otro 60% de la variación. El concepto de dividir la variación de los componentes, llamada partición de la varianza es fundamental en genética cuantitativa. Por ejemplo, en ocasiones podemos estar interesados en conocer que tanto la variación en una característica es asociada con diferencias genéticas entre individuos y que tanto la variación se debe a factores ambientales. Si se usa ANOVA para determinar qué tanto de la variación en la producción de leche se debe a las diferencias ambientales y que tanto se debe a diferencias genéticas. Si gran parte de la variación se debe al medio ambiente, la crianza selectiva hará poco para aumentar la producción de leche, y será mejor trabajar en proporcionar el ambiente óptimo para la obtener una alta producción.^{24,25}

Heredabilidad

Heredabilidad es la proporción de fenotipos de una población que son atribuibles a factores genéticos. Las características continuas pueden ser influenciadas por múltiples genes o por factores ambientales. En los programas de mejora vegetal y animal, es necesario conocer la contribución genética para ciertas características como peso del animal, número de huevos que pone una gallina, y cantidad de lana producida por una oveja. Muchas características de importancia ecológica, variación en el tamaño corporal, fecundidad y nivel de desarrollo son también debidas a múltiples genes y la contribución genética a estas variaciones es importante para conocer como estas poblaciones evolucionan. La heredabilidad es en ocasiones poco entendida, y el término con

frecuencia es usado erróneamente sin una base científica firme. Por ejemplo, en humanos, cuando los individuos de una familia se parecen unos a otros en algún aspecto del fenotipo, como estatura o inteligencia, se asume que esto se debe a una contribución genética. Pero por todas las similitudes entre los miembros de una familia puede deberse también a que comparten el mismo ambiente. Los experimentos de genética cuantitativa son la única manera que se puede distinguir entre la contribución genética y ambiental en los organismos estudiados.

Componentes de la variación fenotípica

Como una analogía, si consideramos la variación entre individuos como un objeto que debe dividirse en varias piezas. En este caso la **variación fenotípica**, representada por V_p es la medida usada para medir la variación en cualquier característica. (El individuo completo). Recordando que la variación fenotípica es la suma del cuadrado de las desviaciones a partir de la media de todos los individuos. (Figura 7) Algunas de las diferencias a partir de la media por cada individuo se deben a diferencias ambientales experimentadas de forma individual. La contribución genética de la variación fenotípica es llamada **variación genética**, representada por el símbolo V_G .



Figura 8.
Variación fenotípica de *Chrysobalanus icaco* L.

Como se conoce, variación adicional puede presentarse por las condiciones ambientales experimentadas por los individuos. La variación ambiental es representada por el símbolo V_E , y su definición incluye cualquier fuente de variación no genética. La temperatura, nutrición, cuidado materno son ejemplos de factores ambientales que pueden provocar diferencias entre los individuos durante el desarrollo. Por lo tanto hay dos piezas en el análisis de un individuo completo que corresponden a naturaleza-crianza:

$$V_P = V_G + V_E$$

El 100% de la variación entre individuos se debe a la genética y a las influencias ambientales; No obstante, determinar cómo se produce exactamente esta variación no es tan fácil de determinar. La suma de las causas genéticas que producen variación y las causas ambientales que producen variación sobre un individuo, pueden no sumar el total de la variación fenotípica, porque la genética produce una variación y el medio ambiente una covariación. Por ejemplo, se cree que la cantidad de leche que producen las vacas está influenciada por los genes, pero esta es también influenciada por la cantidad de alimento que se le suministra. El granjero conoce sus vacas y proporciona más alimento a los descendientes de vacas que son buenas productoras y menos a los que descienden de una madre menos productora. Por lo que los individuos con la mejor calidad genética reciben mejores recursos, se presenta una covarianza entre genotipo y medio ambiente. La variación en la producción de leche se incrementa más allá de la expectativa con base en los genes y el medio ambiente. Por lo que se acuñó otro término ($Cov_{G,E}$), que explique juntas la variación genética y ambiental.

Existe otra fuente de variación fenotípica, las interacciones genotipo-medio ambiente, o $G \times E$. La variación causada por $G \times E$ se presenta cuando los efectos relativos de los genotipos difieren entre ambientes. Por ejemplo, En un ambiente frío, plantas con el genotipo AA presentan una altura de 40 cm y las plantas con el genotipo aa tienen una altura promedio de 35 cm. Sin embargo, cuando estos genotipos se mueven a un clima más templado las plantas aa alcanzan una talla promedio de 60 cm, mientras que las AA alcanzan una talla de 50 cm. Ambos genotipos alcanzan mayor altura en un ambiente templado, por lo que el ambiente tiene un efecto sobre el fenotipo. También existe influencia genética, pero el efecto de la genética depende del ambiente. El desarrollo relativo de los dos genotipos cambia en los dos ambientes. Así que con las diferencias ambientales (temperatura) y diferencias genéticas (genotipo) contribuyen a la variación fenotípica.

La variación fenotípica está compuesta de diferencias en la variación genética, variación ambiental, covariación genética-medio ambiente, e interacción genética-medio ambiente, esto está representado en la siguiente ecuación.

$$V_P = V_G + V_E + 2\text{COV}_{G,E} + V_{G \times E}$$

En esta ecuación hay muchas situaciones en las cuales los componentes individuales son igual a cero, dependiendo de la composición genética y la población, el medio ambiente específico, y como los genes interactúan con el medio ambiente.

Las piezas totales de un individuo que corresponden a la influencia genética y del medio ambiente pueden subdividirse para revelar en forma más precisa cuales son los elementos que producen una variación fenotípica. La variación genética V_G , puede ser subdividida en dos componentes: función del gene e interacción entre genes. Algunas de las variaciones genéticas se presentan como resultado de efectos adicionales a los diferentes alelos sobre el fenotipo. Por ejemplo, un alelo g puede, en promedio contribuir con 2 cm a la altura de una planta, mientras que el alelo G contribuye con una altura de 4 cm. En este caso, el homocigoto gg contribuirá con $2 + 2 = 4$ cm, el heterocigoto Gg contribuirá $2 + 4 = 6$ cm de altura, y el homocigoto GG presentara $4 + 4 = 8$ cm de altura. Para determinar la contribución genética a la altura, se pueden sumar los efectos de los diferentes alelos en el *locus* o alelos de otros *loci* que pueden influenciar el fenotipo. En genes como estos que tiene efectos aditivos y la variación es resultado de la acción de los genes es llamada variación genética aditiva, representada con el símbolo V_A .

Otros genes pueden presentar dominancia, y esto es la variación de dominancia (V_D). Cuando la dominancia está presente, los efectos individuales de los alelos no son estrictamente aditivos. En un *locus* que presenta dominancia se presenta V_p únicamente cuando ambos alelos son recesivos homocigotos y también el heterocigoto o dominante homocigoto está presente en la población. Bajo estas condiciones, por ejemplo, una F_2 o retrocruza con un progenitor recesivo, el *loci* que muestra dominancia incrementa su variabilidad. En el caso de la retrocruza con un progenitor homocigoto dominante, los *loci* con alelos dominantes no producirán variación. La presencia de epistasis suma otra fuente de variación genética llamada epistática o variación por interacción (V_I). La variación genética puede representarse en la siguiente ecuación:

$$V_G = V_A + V_D + V_I$$

La variación total del fenotipo a este punto puede ser resumida como

$$V_P = V_A + V_D + V_I + V_E + 2\text{COV}_{G,E} + V_{G \times E}$$

Los componentes genéticos de variación fueron divididos en 3 partes, y los componentes ambientales de variación pueden también ser divididos. Los individuos de una población pueden ser expuestos a variaciones de temperatura o nutrición durante el desarrollo, produciendo en algunos casos diferencias irreversibles llamadas **efectos ambientales generales** (V_{EG})

Por ejemplo, un individuo que es criado con privación nutricional puede tener una talla pequeña. También el estar expuesto al sol puede provocar diferencias en el pigmento de la piel debido a la exposición excesiva al sol. Estos son llamados **efectos ambientales especiales** (V_{ES}). Finalmente, los efectos ambientales pueden ser compartidos por todos los miembros de una familia. Estos son los **efectos ambientales familiares comunes** (V_{ECF}) y son importantes porque contribuyen a que diferencias entre familias se confundan con diferencias genéticas. Por ejemplo, muchos insectos depositan sus huevecillos en plantas hospederas específicas, y sus larvas se desarrollan alimentándose de esas plantas. Las plantas individuales pueden variar con respecto a su calidad nutricional y los niveles de toxinas presentes. Como resultado los insectos toman componentes de las plantas hospederas para su propia defensa, como la mariposa monarca y la palomilla *Utetheisa*, las cuales presentan diferencias en las familias sencillamente porque las plantas de las que se alimentan presentan diferencias. Estas diferencias son en muchos casos mal interpretados como evidencia de variación genética.

Una categoría especial de efectos ambientales familiares comunes, son los efectos maternos (V_{EM}); por ejemplo la variación en el tamaño de mamíferos y pájaros tiene componentes genéticos y ambientales. Estos componentes ambientales son resultado de las diferencias específicas entre la descendencia. Como el tamaño de la madre, el tamaño del útero, el periodo gestacional, todo esto contribuye a los efectos maternos. Estos efectos pueden presentarse también después del nacimiento, como la cantidad y calidad de la leche suministrada por la madre en los mamíferos, el tamaño de la camada. Esto puede incrementar la variación fenotípica.^{24, 25}

A este punto la variación total del individuo está compuesta de muchos segmentos pequeños, y la ecuación de naturaleza-crianza se representa de la siguiente forma:

$$V_P = V_A + V_D + V_I + V_{EG} + V_{ES} + V_{ECF} + V_{EM} + 2COV_{G,E} + V_{G \times E}$$

Dividiendo la variación fenotípica en estos componentes es útil pensar sobre la contribución de diferentes factores sobre la variación del fenotipo. Por lo que es difícil diseñar experimentos en los que se consideren todas estas variables que pueden afectar el fenotipo.

Heredabilidad en sentido amplio y sentido estrecho

Una de las preguntas más importantes para los genetistas cuantitativos es cuan amplia puede ser la variación entre individuos que es producida por diferencias genéticas. Ellos han estimado que tanto de la variación fenotípica (VP) puede ser atribuida a la variación genética (VG). Esta cantidad es llamada **heredabilidad en sentido amplio**. Esta es calculada como proporción.

$$\text{Heredabilidad en sentido amplio} = H^2_{\text{a}} = \frac{VG}{VP}$$

La heredabilidad de una característica puede tener un rango entre 0 y 1. La heredabilidad en un sentido amplio con valor de 0 indica que no hay variación en el fenotipo entre individuos como producto de diferencias genéticas. Mientras que un valor de 1 sugiere que la variación en los fenotipos está genéticamente determinada. La heredabilidad en sentido amplio ignora la división de la variación genética.

El coeficiente de heredabilidad en sentido estrecho se considera como uno de los parámetros genéticos más importantes, ya que indica la proporción de la variación fenotípica atribuible al efecto medio de los genes, lo que propicia su papel predictivo, por expresar la confianza del valor fenotípico como guía para seleccionar un valor genético. Así mismo se define como la proporción de la variación fenotípica que es producto de la variación genética aditiva.

$$\text{Heredabilidad en sentido estrecho} = H^2_n = \frac{VA}{VP}$$

Comprendiendo la heredabilidad

La heredabilidad tiene varias limitaciones significativas. Desafortunadamente estas limitaciones son frecuentemente ignoradas, haciendo la heredabilidad uno de los conceptos menos comprendidos en genética.

Antes de discutir cómo se determina la heredabilidad y se aplica, es importante enlistar algunas cualificaciones y limitaciones de la heredabilidad;

1. **La heredabilidad en sentido amplio no define completamente la base genética de una característica.** La heredabilidad en sentido amplio mide la proporción de la variación fenotípica que es producto de las diferencias genéticas entre individuos en una población específica.

Cuando una característica no es variable, como el número de ojos u orejas en humanos, no es posible estimar la heredabilidad. Si todos los individuos de una población tienen alelos idénticos en el *loci* que controla la característica, entonces la variación genética será 0 ($V_G=0$). Aunque la heredabilidad en este caso es 0, puede ser un valor incorrecto porque puede asumirse que los genes no tienen ningún papel en el desarrollo de la característica. De forma similar, una alta heredabilidad no niega la importancia de los factores ambientales que influyen una característica; una alta heredabilidad puede querer decir únicamente que los factores ambientales afectan de la misma forma a los individuos estudiados.

2. **La heredabilidad no indica que la proporción de un fenotipo individual es genético.** Esto está basado en la varianza, la cual puede calcular únicamente un grupo de individuos, heredabilidad es una característica típica de una población. Un individuo no tiene heredabilidad; pero la característica de una población si la presenta.
3. La heredabilidad no está fijada a una característica. El valor de heredabilidad para una característica depende de la genética y el ambiente específico de una población. Los genes no son el único factor que influye en la altura en humanos. La dieta, es un efecto ambiental, es el principal determinante de la altura. La heredabilidad puede ser aplicada

solo a un pequeño grupo de individuos en un ambiente específico. Si la composición genética del grupo es diferente, o el ambiente es diferente, la heredabilidad estimada no puede ser transferida.

El cambiar los grupos de ambiente no altera el hecho de que los genes afectan una característica, pero puede cambiar la cantidad de variación genética y ambiental para la característica y entonces alterar la heredabilidad.

1. **Una alta heredabilidad no implica que las diferencias entre poblaciones por la misma característica estén genéticamente determinadas.** Por ejemplo, si suponemos que no observamos una variación genética en ratones de dos grupos. Podemos alimentar un grupo con una dieta rica y tener cuidado de proporcionar a cada ratón la misma cantidad de alimento, espacio para vivir, agua y otros aspectos ambientales importantes. El ratón obtendrá una talla grande debido a la dieta rica. Si cuando se mide la heredabilidad en peso de los ratones se obtiene un valor elevado de 0.93. El peso alto no es una sorpresa debido a la dieta y a las condiciones ambientales. El segundo grupo de ratones tienen la misma genética que el primer grupo, pero si se alimentan con una dieta pobre, y se le dan las mismas condiciones de espacio y requerimientos ambientales que el primer grupo. Debido a la dieta pobre estos ratones tendrán un peso menor que el primer grupo; sin embargo al obtener heredabilidad, se obtendrá el mismo valor de 0.93 que el primer grupo, porque los ratones son genéticamente variables y las diferencias ambientales se notan poco.
2. **Las características compartidas por dos miembros de la misma familia, no necesariamente tienen una alta heredabilidad.** Una característica compartida por los miembros de una familia es definida como **característica familiar**. Las características familiares pueden incrementarse debido a que los miembros de la familia comparten genes o porque están expuestos a los mismos factores ambientales. Por lo que familiaridad no es lo mismo que heredabilidad.^{23,22}

¿Cómo se calcula la heredabilidad?

Existen varios métodos disponibles para calcular heredabilidad que involucran la comparación de individuos con diferente grado de relación. Todas estas comparaciones están basadas en la premisa de que si controlamos el ambiente,

los genes son importantes para determinar la variación fenotípica, entonces los individuos relacionados de forma cercana pueden tener un fenotipo más similar porque comparten más genes. Alternativamente, si los factores ambientales son responsables de determinar las diferencias en la característica, entonces los individuos relacionados de forma cercana no serán más similares en el fenotipo que los que no son cercanos. Un factor importante para tener en cuenta es que los individuos relacionados estudiados no deben de compartir más condiciones ambientales que los no relacionados, debido a que esto puede incrementar la covarianza. La manipulación de los factores ambientales frecuentemente puede realizarse en animales domésticos y plantas en el campo, proporcionando las condiciones requeridas para experimentos de heredabilidad. Estas condiciones son muy difíciles de obtener en humanos, sin embargo, algunas estructuras familiares y el cuidado paterno puede crear ambientes comunes para muchos individuos relacionados. Si los individuos relacionados comparten un medio ambiente, mayor a la que comparten con individuos no relacionados, es prácticamente imposible de separar el efecto de los genes y el medio ambiente.

Los diseños padres-descendencia, comparan la variación fenotípica entre padres y su descendencia.

La regresión padres-descendencia es uno de los métodos usados más comúnmente. Una característica específica es medida tanto en los padres como en la descendencia, a la misma edad y se compara usando una regresión. La pendiente de la regresión nos indicará el **parecido entre padres - descendencia**. Lo que se representa con el símbolo

$$b_{op} = \frac{V_a}{2V_p} = \frac{1}{2}h^2$$

Fórmula, un padre-descendencia

Un padre-descendencia es la comparación entre la madre o el padre y la descendencia, y da un estimado de la mitad de la heredabilidad en sentido estrecho: La pendiente de la regresión padre-descendencia puede diferir de la pendiente de la regresión madre-descendencia, debido a efectos maternos, un componente de la variación ambiental que puede ser usada para determinar el efecto del ambiente maternal sobre una característica específica.

$$\mathbf{b}_{\text{op}} = \frac{V_a}{V_p} = h^2$$

Fórmula para la regresión mitad paterna-descendencia.

La **mitad paterna-descendencia** da un promedio de los dos padres y proporciona un estimado del total de la heredabilidad en sentido estrecho. Es a la mitad ya un descendiente comparte únicamente la mitad de los genes con uno de los padres. De forma similar, otras combinaciones de parientes pueden ser usadas (hermanos completos y medio hermanos, gemelos idénticos y fraternos etc.) En estos casos el factor de la pendiente debe ser multiplicado para obtener un estimado de la incremento de la heredabilidad entre parientes (Tabla 5).^{23, 26, 27}

TABLA 5.
Valores de heredabilidad de rasgos en los seres humanos,
Animales domésticos y de las poblaciones naturales.

<i>ORAGNISMO</i>	<i>RASGO</i>	<i>HEREDABILIDAD</i>
HUMANOS	ESTATURA	0.65
Ganado	Niveles sericos de Inmunoglobulinas	0.45
	Producción de leche	0.35
	Contenido de grasa butírica	0.40
	Peso corporal	0.65
Los cerdos	Espesor de grasa dorsal	0.70
	Tamaño de la camada	0.05
Las aves de corral	Peso del huevo	0.50
	La producción de huevos (70 semanas)	0.10
	El peso corporal (a las 32 semanas)	0.55
	Peso corporal	0.35
Ratones	Abdominal número de cerdas	0.50
	Tiempo de germinación	0.29
Chinche	La longitud del ala (mujeres)	0.87
	La fecundidad (mujeres)	0.50
Mirón primavera (rana)	La talla de la metamorfosis	0.69
Madera de la rana	Evolución de los tipos (con una población de montaña)	0.31
	La talla de la metamorfosis (población de las montañas)	0.62

Respuesta a la selección

La genética cuantitativa, tiene un papel importante en la biología evolutiva y mejora vegetal y animal. Estos campos están relacionados al cambio genético entre grupos de organismos: la definición de **evolución**. Evolución por **selección natural** ocurre porque individuos con ciertas características producen más descendencia que otros. Los procesos artificiales de selección, donde individuos superiores son desarrollados para producir variedades o linajes mejores. Si las características seleccionadas tienen una base genética en su situación, entonces la estructura genética de la población seleccionada la cual cambiará con el tiempo y evolucionará. La **selección artificial** es una poderosa herramienta que permite tener un cambio y evolución rápida, como evidencia es la evolución rápida observada en animales domésticos y plantas. Por ejemplo, todos los perros domésticos descienden del lobo. El gran número de razas que existen actualmente, se combinan con una gran variedad de tamaños, colores e incluso conducta; estos han sido producidos por selección artificial.

La selección natural y artificial depende de la presencia de variación genética. La cantidad y el tipo de variación genética presente son cruciales en la determinación de lo rápido que un cambio puede presentarse. Por lo que evolucionistas y mejoradores, utilizan la genética cuantitativa para estimar la cantidad de variación genética y predecir el nivel y magnitud de un cambio genético.

Estimando la respuesta de la selección

Si la variación genética de una característica en una población y la selección natural y artificial se imponen sobre un fenotipo, entonces el valor medio del fenotipo en la población cambia de una generación a otra. La cantidad que un fenotipo cambia de una generación a otra es llamada respuesta a la selección o **respuesta de selección, R**.

Para ilustrar este concepto de respuesta de selección, imaginen a un genetista trabajando para producir una cepa de *Drosophila melanogaster* con un cuerpo grande. El genetista inicia por examinar las moscas de una población y mide el cuerpo de las moscas, a partir de estos datos puede dividir la población con respecto al tamaño del cuerpo. La mitad de la población es entrecruzada normalmente. Por otra parte, el genetista selecciona únicamente moscas con el cuerpo grande y los coloca en frascos de cultivo separados para entrecruzarlos.

Después de que las dos generaciones de la F1 emergen, el genetista mide nuevamente el tamaño del cuerpo de las dos poblaciones de la F1. Aquí se esperaría que el tamaño de las moscas seleccionadas fuese mayor que las que se les permitieron entrecruzarse libremente. La respuesta de selección al tamaño del cuerpo puede ser calculado como la diferencia entre la media del tamaño del cuerpo de las F1 seleccionadas entre la media del tamaño del cuerpo de las F1 no seleccionadas. Si la población seleccionada tiene un peso de 2.0 y las no seleccionadas de 1.4 mg, una respuesta de selección de 0.7 mg se presenta.

La respuesta de selección depende de dos factores: la heredabilidad en sentido estrecho y la selección diferencial, s . La selección diferencial se define como la diferencia entre la media del fenotipo de los padres seleccionados y la media de la población antes de la selección. La respuesta de selección está relacionada a la selección diferencial y a la selección en sentido estrecho y se calcula por la siguiente fórmula:

$$R = H^2_N S$$

Con valores de dos o tres parámetros en esta ecuación, la respuesta de selección (0.7mg) y el diferencial de selección (1.7mg), se puede resolver la heredabilidad en sentido estrecho:

Heredabilidad en sentido estrecho = H^2_N respuesta de selección/selección diferencial.

$$\text{Por lo que } H^2_N = 0.7 \text{ mg} / 1.7 \text{ mg} = 0.41$$

Experimentos como este proporcionan otra medida para estimar la heredabilidad en sentido estrecho.

Correlaciones Genéticas

Cuando dos o más fenotipos están correlacionados, las características no varían independientemente. Por ejemplo: piel blanca, cabello rubio y ojos azules, frecuentemente se encuentran juntos en el mismo individuo. La asociación no es perfecta, en algunas ocasiones podemos ver individuos con cabello oscuro, piel blanca y ojos azules, pero las que se encuentran juntas con regularidad se dice que están correlacionadas. La correlación fenotípica entre dos características

cuantitativas puede ser analizada para calcular el coeficiente de correlación entre dos características.

Los genes raramente afectan una sola característica, y esto es particularmente cierto debido a los poli genes que tienen influencia sobre características continuas. Por ejemplo, los genes que afectan el peso y la altura, de estos dos fenotipos tienden a estar correlacionados. La pleiotropia es una de las causas principales de **correlación genética** para características cuantitativas.

Otra causa significativa de correlación genética es el linaje genético, aunque el linaje genético es una violación a la tercera ley de Mendel (herencia independiente de caracteres), ya que el *loci* más cercano sobre un cromosoma, tiene la mayor frecuencia de alelos heredables juntos. Cuando un nuevo alelo es producido por mutación y está asociado a otros alelos sobre un cromosoma en particular. Estos nuevos alelos se heredaran en conjunto con los alelos a los que están ligados, provocando una correlación genética, y la persistencia de esa correlación con el paso del tiempo, depende en parte a la cantidad de recombinaciones del *loci*. Una diferencia importante entre linaje y pleiotropia son las causas genéticas de esta correlación sobre un tiempo de evolución, incluso los linajes más relacionados pueden separarse, permitiendo una nueva asociación entre alelos. (Tabla 6) Con la pleitropia sin embargo, limitantes funcionales sobre proteínas individuales hace que estas puedan ser disociadas, causando una correlación persistente.^{22,24}

Tabla 6.
Correlaciones genéticas entre los rasgos en los seres humanos

<i>Organismos</i>	<i>Rasgos</i>	<i>Correlación genética</i>
Humanos	IgG, IgM	0.07
Ganado	Contenido de grasa, la producción de leche.	-0.38
Cerdos	Aumento de peso de grasa dorsal de espesor.	0.13
Pollos	El peso del huevo, la producción de huevos.	-0.31
Drosophila	Fecundidad primeros años de vida, resistencia a la inanición.	-0.91
Ranas	Tasa de desarrollo, el tamaño en la metamorfosis.	-0.86

Las correlaciones genéticas pueden ser positivas o negativas. Una correlación positiva significa que los genes provocan un incremento en la magnitud de una característica la cual trae un incremento simultáneo en la magnitud de otra característica. En gallinas por ejemplo, el peso de la gallina y el tamaño de huevos tienen una correlación positiva. Si los mejoradores seleccionan las gallinas más pesadas, tanto el peso de las gallinas como el tamaño de los huevos ovipositados se incrementará con el tiempo. Este incremento en peso de los huevos se presenta porque los genes que producen gallinas más grandes se presume tienen un efecto pleiotrópico sobre el tamaño de los huevos. En el caso de una correlación negativa, los genes que causan incremento en una característica, provocan una disminución en otra. Por ejemplo cuando los mejoradores seleccionan a las gallinas que ponen huevos más grandes esto provocará que se oviposite un número menor de huevos.

Las correlaciones negativas entre características frecuentemente representan limitaciones que deben de balancearse bajo presión de selección. Por ejemplo en la producción de berenjenas se ha demostrado una correlación negativa entre el número de frutos por planta y el peso de los mismos. (Tabla 7)

La capacidad de un organismo de adaptarse a un ambiente en particular está fuertemente influenciada por las correlaciones genéticas entre características, lo cual las hace de gran interés en estudios de evolución, ya que permite comprender como los organismos se adaptan o fracasan en adaptarse a un ambiente en particular.

Tabla 7.
Tabla de correlación genética en diferentes organismos.

<i>Organismo</i>	<i>Rasgos</i>	<i>Correlación genética (-/+)</i>
Humanos	IgG, IgM	0.07
Ganado	Producción de leche, Contenido de grasa butírica	-0.38
Cerdos	Espesor de grasa	0.13
	La eficiencia	0.69
Pollos	El peso del huevo, la producción de huevos	-0.31
	produccion	-0.17
Ratones	Peso corporal, longitud de la cola	0.29
Drosophila	Primeros años de la fecundidad, resistencia a la inanición	-0.91
Chinches	la longitud del ala, la fecundidad	-0.57

Loci de características cuantitativas

La estadística es de gran importancia para la comprensión de herencia cuantitativa y es usada en el análisis de componentes de variación y respuesta a la selección. Sin embargo, para comprender las características cuantitativas completas, es necesario caracterizar los *loci* que afectan estas características individualmente. Los *loci* individuales que afectan características cuantitativas, se conocen como QTLs (Quantitative Trait Loci) y el grupo de QTLs y su interacción para determinar un rasgo o característica se conoce como arquitectura genética de una característica. Avances recientes en la combinación de genotipificación molecular y herramientas estadísticas permiten a los genetistas hacer la relación entre fenotipos cuantitativos y los específicos QTLs que los controlan.^{28,18}

La identificación de QTL permite encontrar segmentos en el genoma asociados a las diferencias fenotípicas entre individuos. Esto se convierte en una herramienta más poderosa cuando se analiza una población con un mapa detallado de linaje, variación fenotípica y un gran número de individuos. Métodos analíticos son usados para determinar que regiones están correlacionadas con la variación fenotípica.

Otra forma de encontrar QTLs involucra probar las asociaciones entre diferencias fenotípicas y la variación alélica del *loci* candidato. *Loci* candidatos pueden ser definidos sobre la base de conocer o sugerir su función.

Los genes que determinan características cuantitativas en humanos no pueden ser determinadas por los análisis tradicionales de pedigree por ser características discontinuas las diferencias ambientales a través del tiempo y la acción de otros genes segregantes tienden a ocultar los efectos de un simple *loci*. Sin embargo, segmentos importantes del genoma que tienen efecto en la variación fenotípica pueden ser identificados en asociación con estos estudios. Los estudios de asociación utilizan marcadores moleculares.^{18,28}

El mapeo de genomas

El mapeo genético ha surgido como una herramienta potencial para las ciencias biológicas. Sirviendo como plataforma para nuevas ideas heredadas del concepto de genética clásica, así como descubrimientos recientes en biología molecular e ingeniería genética. Las estrategias utilizadas en el mapeo de genomas involucran herramientas tradicionales, así como modernas. El mapeo genético ha facilitado el enriquecimiento de casi todas las ramas de las ciencias biológicas,

incluyendo evolución y relaciones filogenéticas; organización de los genomas; localización, aislamiento, secuenciación y manipulación de genes.

El término genoma significa el “contenido de DNA” presente en un organelo: núcleo, mitocondria o cloroplasto. Un mapeo genético es la descripción de la información genética contenida en un organelo que controla los atributos de un organismo. El ordenamiento lineal de los genes en los cromosomas en este genoma permite la aplicación de los “marcadores moleculares”

Mapeo genético: Un resumen histórico

El concepto de mapeo genético deriva del “ligamiento genético” propuesto por Morgan (1910) y se refiere como un producto del “mapeo de ligamiento”, estrategia obtenida de la “escuela de *Drosophila*”, El desarrollo de mapas en *Drosophila* involucró la aplicación de mutantes con caracteres morfológicos perceptibles, conocidos como “marcadores visibles” o como “marcadores de características heredadas” SITM. El mapeo de linajes utiliza estos marcadores como se han usado en otros organismos incluyendo frijol, maíz, *Arabidopsis*, arroz, etc., para desarrollar mapas genéticos parciales.²⁹

Los mapeos genéticos que utilizan STIM presentan varias limitaciones. Dos organismos de una especie tienen unos pocos caracteres que contrastan con su expresión (fenotipos). Los mapeos genéticos, requieren un gran número de experimentos de apareamientos por un largo periodo de tiempo. Las características morfológicas comprenden solo una pequeña proporción del número total de genes en un organismo que tenga regiones genéticamente activas. Por lo tanto, el número de SITMs es también escaso para representar un genoma entero. Nuevamente, mutaciones para muchos caracteres pueden provocar letalidad, y los *loci* de muchos caracteres no pueden ser usados como marcadores. Otra limitación de estos marcadores es la influencia del medio ambiente, interacción inter-alélica o genes modificados por ejemplo.

También se han llevado a cabo intentos para hacer uso de algunas características cromosómicas para mapeos genéticos. Esta estrategia comprende la inducción de deleciones por mutágenos y correlacionar estos con las características afectadas. Este enfoque fue exitoso en pocos organismos, porque producen deleciones que en ocasiones producen letalidad.

Los marcadores de proteínas (isoenzimas) surgieron como otra herramienta prometedora para mapeo genético³⁰. En esta técnica se usa el desarrollo de un mapa genético parcial en algunos organismos³¹. El número, sin embargo, es

poco para desarrollar mapas genéticos completos, por lo que los marcadores de proteínas son usados principalmente para etiquetar genes de valor económico.

Los descubrimientos en el campo de la genética molecular en los 50's, 60's y 70's en el siglo XX culminaron con el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante, permitiendo el uso de DNA como fuente de la mayoría de los marcadores moleculares para un mapeo completo del genoma.

Desde el descubrimiento de “polimorfismo de fragmentos largos de restricción” (RFLP's) como la primera generación de marcadores de DNA en 1980³² y su uso en el mapeo del genoma humano, los RFLP's han sido ampliamente utilizados en diversos organismos tanto de animales como de plantas. Posteriormente se han descrito otros marcadores moleculares. Estos están basados en los mismos principios de RFLP y la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)^{33,34}. Un arreglo de marcadores de DNA está disponible para cada organismo específico, población o propósito.

Durante el último cuarto del siglo XX, las técnicas también desarrollaron la clonación de grandes segmentos de DNA, en vectores para el desarrollo de bibliotecas genómicas y para transformación genética; así como la aplicación de la secuenciación del DNA. Estas técnicas facilitaron la construcción de mapas físicos.

El mapeo genético aunque originalmente se inició en el genoma humano, pero ha sido más efectivo y extensamente usado en los sistemas vegetales. El número de mapas construidos en plantas superiores excede al de las especies de animales superiores.

Mapeo genético: Estrategias generales

En la construcción de mapas de linaje genético, básicamente la estrategia clásica comprende principalmente los siguientes pasos:

1. Selección de los progenitores genéticamente diferentes con el objetivo de un óptimo polimorfismo de DNA.
2. Identificación de sondas/primers para detectar polimorfismo de DNA en los progenitores.
3. Aumento de las poblaciones segregantes para evaluar los acontecimientos de recombinación
4. Análisis de linaje y construcción de mapas de linaje.

Marcadores de DNA para el mapeo genético

Los genes pueden ser utilizados como marcadores moleculares, pero no es lo ideal. Esto se debe a que en los genomas grandes como en vertebrados y en angiospermas, un mapa basado completamente en genes no es muy detallado. Debido a que únicamente una fracción del número total de genes de mapeado. Por lo que se han desarrollado otro tipo de marcadores.

Los mapas que no usan genes se llaman marcadores de DNA. Los principales marcadores de DNA son: Amplificación de polimorfismo al Azar (RAPD's), Polimorfismo de fragmentos grandes de restricción (RFLP's), Microsatélites y polimorfismo de nucleótido sencillo (SNP's).³⁵

Polimorfismo de fragmentos grandes de restricción (RFLP's)

Este método se basa en enzimas de restricción que cortan el DNA en sitios específicos, esto significa que al cortar un DNA de la misma procedencia (del mismo genoma) se producirán los mismos fragmentos. Sin embargo en algunos DNA genómicos se presentan sitios polimórficos, en donde existen 2 alelos, con un alelo que presenta el sitio de corte correcto para la enzima de restricción y el segundo alelo que presenta una alteración en la secuencia por lo que el sitio de corte puede no reconocerse. (Figura 8)

Figura 9.

RFLP's, el fragmento de la izquierda, presenta un sitio de restricción polimórfico (marcado con un asterisco) el que no esta presente en el fragmento de la derecha.



Para determinar un RFLP, es necesario determinar el sitio de corte de uno o dos fragmentos contra muchos fragmentos que resultarían irrelevantes. Esto no es sencillo, por ejemplo, una enzima como EcoRI, la cual reconoce una secuencia de 6 nucleótidos, puede cortar aproximadamente 800,000 fragmentos

en el genoma humano; cada fragmento producirá una banda cuando se somete a electroforesis en gel de agarosa; estos 800,000 fragmentos solo producirán una mancha y los RFLP no podrán ser reconocidos. Existen 2 métodos para determinar RFLP's, 1) Estos pueden ser determinados por hibridación Southern, en la cual el DNA es digerido con la enzima de restricción apropiada y separada en gel de agarosa, los fragmentos de restricción son transferidos a una membrana de nylon y una sonda con la secuencia complementaria marcará el sitio de restricción. Si el sitio de restricción está ausente, entonces se dice que se detecta un fragmento sencillo de restricción. 2) Si el sitio está presente en los 2 fragmentos el RFLP puede ser también detectado por PCR. Después de la PCR los productos son tratados con la enzima de restricción y analizados en electroforesis en gel de agarosa. Si el sitio está ausente solo se podrá observar una banda en el gel de agarosa, si el sitio está presente se observarán 2 bandas. (Figura 9)

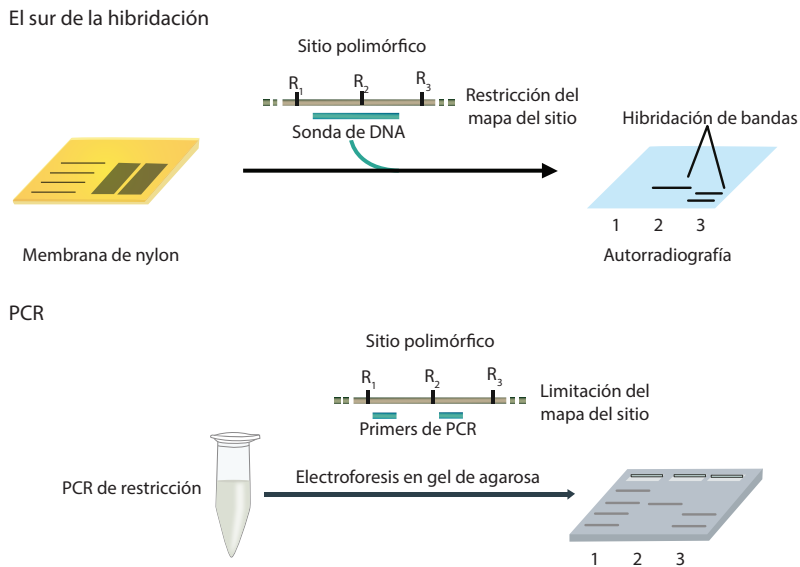


Figura 10.

Los productos son tratados con la adecuada enzima de restricción y luego analizados por el gel de agarosa electroforesis. Si el sitio está ausente entonces una banda se visualizaran en el gel de agarosa, si el sitio está presente, entonces dos bandas serán visualizadas.

Los RFLP's tienen varias ventajas para ser aplicados en el mapeo genético. Pueden producirse en un número infinito y son muy buenos para construir mapas de linaje primario con una cobertura óptima del genoma. Es codominante lo que facilita el distinguir entre homocigoto y heterocigotos. Están casi libres de cualquier asociación interalélica, particularmente epistasis, que son fácilmente influenciados por las condiciones ambientales. La única limitación de los RFLP's es la necesidad de tener bibliotecas genómicas y sondas.

RADPs son los segundos marcadores en utilidad en mapeo genético, particularmente en plantas. Están basados en PCR y son detectados por el uso de un único primer de una secuencia corta aproximadamente 10 mers.

La principal ventaja de RAPD es la simplicidad de la técnica asociada con la rapidez y el costo. RAPD en teoría puede detectar la mayor parte del genoma. Un solo "primer" puede detectar más de un *locus*. La mayor limitación de estos marcadores es su dominancia e interacción intra-alélica. Debido a su dominancia no es posible distinguir entre homocigotos y heterocigotos y un problema adicional es su baja reproducibilidad. (Figura 10)

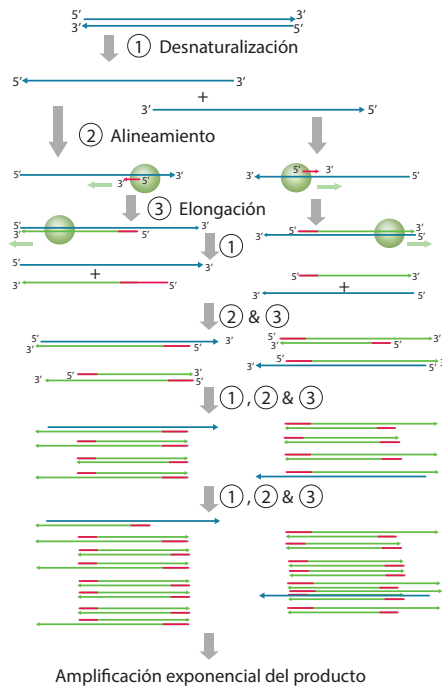


Figura 11. RAPD's-PCR

Se han propuesto nuevos marcadores como AFLP's, Microsatélites y más recientemente SNP's. Estos son capaces de detectar polimorfismo, inclusive en individuos relacionados de forma cercana. Microsatélites también se han usado para enriquecer mapas primarios de linaje en plantas.

Polimorfismo de nucleótido sencillo

Estas son posiciones en el genoma en donde algunos individuos tienen un solo nucleótido por ejemplo G y otros tienen un nucleótido diferente por ejemplo C

Por lo que en el genoma pueden presentarse un gran número de SNP's (más de 4 millones en el genoma humano), algunos de los cuales también dan lugar a RFLP's. (Figura 11)

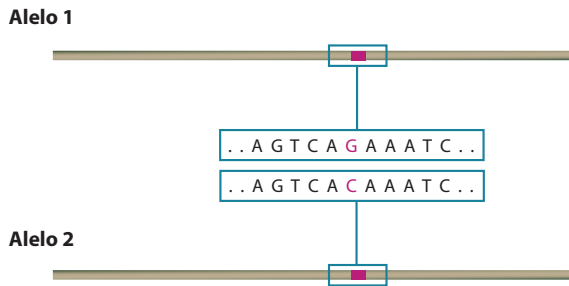


Figura 12. Polimorfismo de nucleótido sencillo, en la cual puede observarse un punto de mutación en el alelo 2.

Cuando uno de los 4 nucleótidos puede estar presente en una posición en el genoma, se puede imaginar que cada SNP puede tener 4 alelos, teóricamente esto es posible, pero en la práctica en la mayoría de los SNP solo se presentan como dos variantes. Esto es porque un SNP se origina cuando un punto de mutación ocurre en el genoma, convirtiendo un nucleótido en otro. Si la mutación está en una célula reproducible de un individuo, entonces uno o más de sus descendientes heredarán la mutación y, después de muchas generaciones, los SNP eventualmente se establecerán en la población. Pero existen solo dos alelos, el de la secuencia original y el de la secuencia mutada. Para que se presente un tercer alelo debe de presentarse una nueva mutación en la misma posición en el genoma de otro individuo; y si este individuo se reproduce, sus descendientes pueden heredar la mutación y un nuevo alelo se establecerá. Esto no es imposible, pero es difícil de que se presente.

Mapeo de poblaciones

Diferentes poblaciones segregantes han sido utilizadas para mapeo genético en plantas. Estas incluyen las poblaciones: F_2 autofecundadas o entrecruzadas, retrocruzamiento (BC), doble haploide (DH), recombinante consanguíneo (RI) e inter-apareamiento (IM). En los sistemas animales, como en el caso del ratón, líneas RI son producidas por apareamientos entre hermanos y usados para el mapeo en humanos como en el “Centro de Estudios sobre polimorfismo humano” “CEPH”.

La elección del mapeo de población depende de varias consideraciones incluyendo la forma de reproducción y conducta de crianza de un organismo, tipo de marcador disponible, características a ser mapeadas y densidad del mapa deseado. Una población de retrocruza es planteada por cruzamientos de híbridos F1 con uno de los padres. Esto es segregar el alelo por herencia desde el padre no-recurrente. Cualquier cruzamiento individual, contienen un cromosoma recombinante en un par homólogo. Las poblaciones producto de cruzamientos experimentan un ciclo de meiosis que llevan un fuerte linaje entre alelos marcadores heredados de un padre común. En ciertos cruces específicos la autofecundación lleva a una esterilidad pero el entrecruzamiento facilita la recuperación de progenie fértil. En muchos casos el mapeo genético se hace en poblaciones retrocruzadas. Esto requiere solo dos generaciones para llevarse a cabo. Las limitaciones de usar poblaciones retrocruzadas es que el mapeo genético incluye la menor recombinación por gameto y la propagación puede llevarse a cabo solamente a través de propagación clonal

Las poblaciones F2 se producen a través de recombinación de un F1 que se interaparea entre F1s. para esto se necesitan solo dos generaciones. La posibilidad de tres genotipos, en todas las posibles combinaciones de alelos paternos hace el mapa altamente utilizado para estudiar todo tipo de acciones en los genes. Los dos cromosomas de pares homólogos experimentan eventos de recombinación y por ende, proporciona el doble de información más que las poblaciones retrocruzadas. Las poblaciones F2 han sido utilizadas para la mayoría de los programas de mapeo hasta la fecha. Las poblaciones F2 retrocruzadas son usadas para la construcción de mapas de linaje genético primarios en un organismo.²⁴

El análisis de ligamiento es la base del mapeo genético

Las técnicas de mapeo genético están todas basadas en los análisis de linaje genético, los cuales derivan de los descubrimientos de Mendel en siglo XIX.

Los principios de la herencia y el descubrimiento del linaje.

El mapeo genético está basado en los principios de la herencia descritos por Gregor Mendel en 1865. De los resultados en sus experimentos de cruzamiento con chícharos, Mendel concluyó que cada chícharo posee dos alelos por cada gen, pero muestra un solo fenotipo. Esto es fácil de comprender si la planta es de línea pura, u homocigota, por las características particulares, que ellas poseen dos alelos idénticos y presentan un fenotipo apropiado. (Figura 12)

Autofecundación de plantas de guisante puras de cría



Figura 13.

Mendel estudió siete pares de características contrastantes en plantas de chícharos, una de estas fue el color de flores que eran flor color violeta y flor blanca, como se muestra aquí.

Aleatoriamente. En otras palabras, si los alelos del padre son Aa, cualquier miembro de la generación F1 puede tener la misma posibilidad de heredar el alelo A o heredar el alelo a. La segunda ley dice que los pares de **alelos segregan independientemente**, o que la herencia de los alelos del gen A es independiente de la herencia de los alelos del gen B.

Cuando el trabajo de Mendel fue redescubierto en 1900, esta segunda ley preocupó a los primeros genetistas, porque se estableció que los genes residen en los cromosomas, y era obvio que todos los organismos poseían más genes que cromosomas. Los cromosomas se heredan como unidades intactas, por lo que se pensó que los alelos de algunos genes podrían heredarse juntos porque pertenecen al mismo cromosoma (Figura 14). Este es el principio del ligamiento genético, y pronto se demostró que es correcto, aunque los resultados no se dieron exactamente como se esperaba; la relación completa que se había previsto entre los pares de alelos no llegó a materializarse. Los pares de genes que se heredan independientemente como los que pertenecen a diferente cromosoma, si llegan a mostrar alguna relación esta será únicamente una relación parcial: Algunas veces estos se heredan juntos o algunas veces no (Figura 15). La resolución a esta contradicción entre teoría y observación fue el paso crítico en el desarrollo de las técnicas de mapeo genético.³⁵

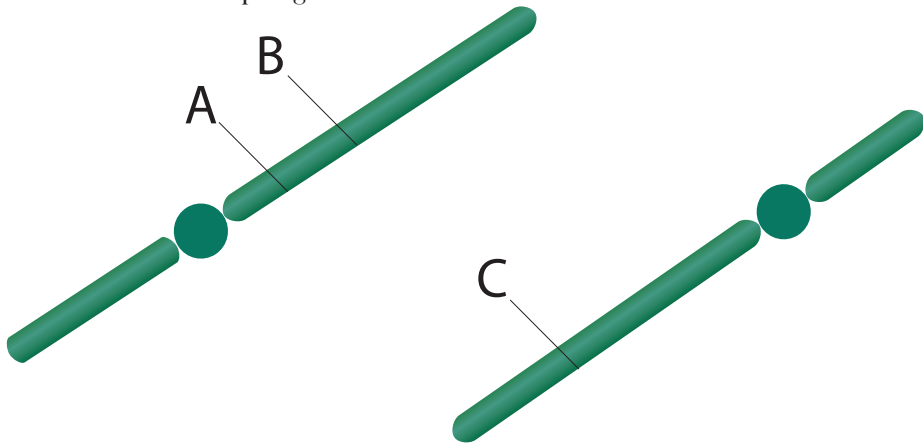


Figura 14.

Genes del mismo cromosoma pueden presentar ligamiento. Los genes A y B están en el mismo cromosoma y pueden heredarse juntos.

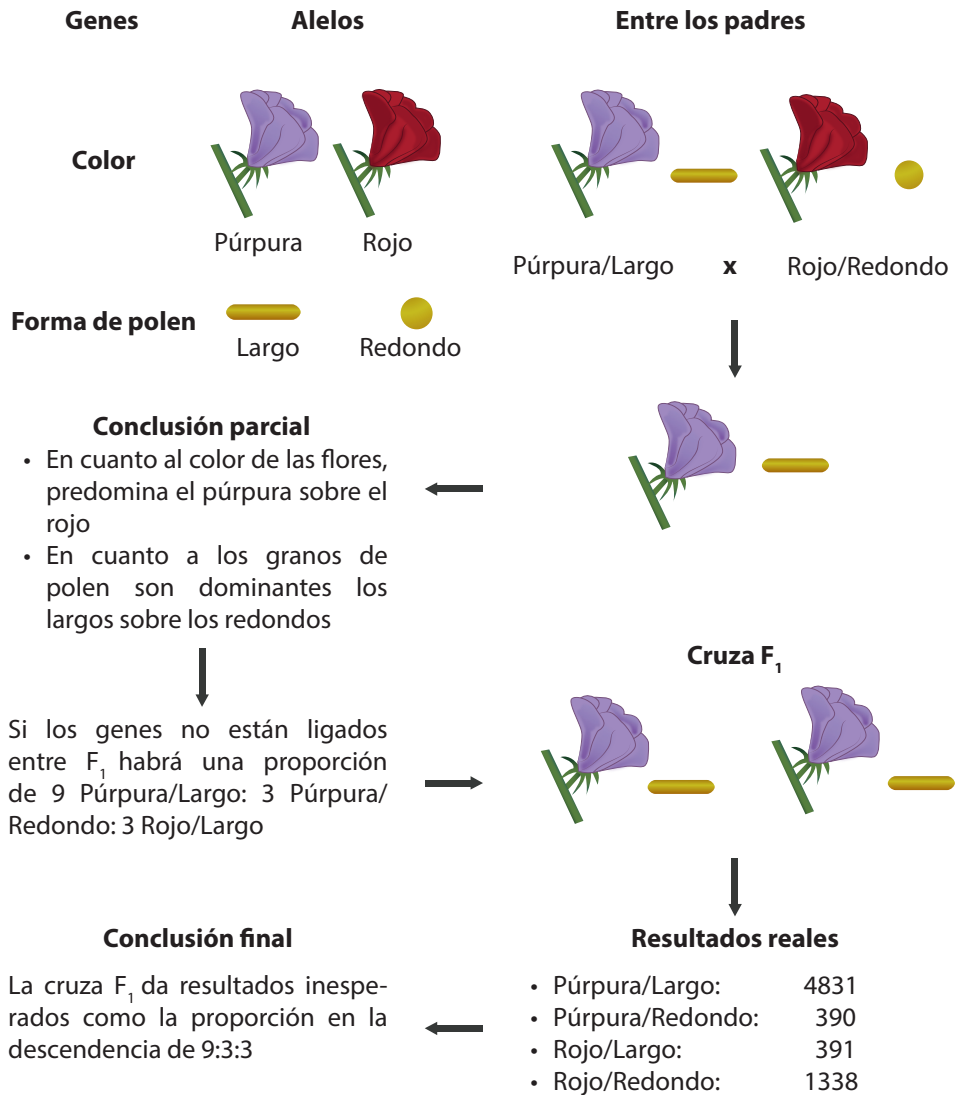


Figura 15.

La crusa F_1 da resultados inesperados como la proporción en la descendencia de 9: 3: 3: una relación (que se espera de los genes en los cromosomas diferentes) y de tres: una relación (que se espera si los genes están totalmente vinculados). Una relación poco común es típica de la vinculación parcial.

El ligamiento parcial es explicado por el comportamiento de los cromosomas durante la meiosis

La explicación conceptual fue llevada a cabo por Thomas Hunt Morgan, que determinó la relación entre ligamiento parcial y el comportamiento de los cromosomas, cuando el núcleo se divide. Los citólogos al final del siglo XIX hicieron la distinción entre dos tipos de división celular: mitosis y meiosis. La mitosis es más común, y es el proceso mediante el cual el núcleo diploide de una célula somática se divide para producir 2 núcleos hijos, los cuales son diploides. Aproximadamente 10^{17} mitosis se necesitan para producir todas las células durante la vida de un humano (Figura 16). Antes de que la mitosis inicie, cada cromosoma en el núcleo es replicado, pero los cromosomas resultantes no se separan inmediatamente uno del otro. Al inicio permanecen unidos a su centrómero. Las cromátidas se separan más tarde en la mitosis cuando los cromosomas son distribuidos entre los dos nuevos núcleos. Es importante que cada nuevo núcleo reciba el grupo completo de cromosomas.³⁶

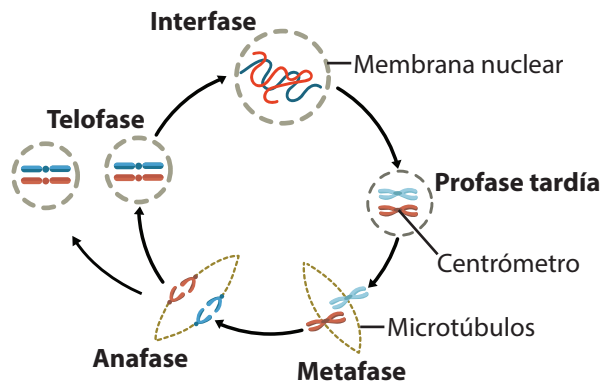


Figura 16.

Durante la interfase (el período entre las divisiones nucleares) los cromosomas se encuentran en su forma extendida. Al inicio de la mitosis los cromosomas se condensan y por la pro-fase tardía han formado estructuras que son visibles con el microscopio de luz. Cada cromosoma ya ha sido objeto de la replicación del DNA, pero los dos cromosomas hijos se mantienen unidos por el centrómero.

Durante la meta-fase de la membrana nuclear se rompe (en la mayoría de los eucariotas) y los cromosomas se alinean en el centro de la célula. Microtúbulos ahora a los cromosomas hijos hacia los extremos de la célula. En la telofase, volver a las membranas nucleares se forman alrededor de cada conjunto de cromosomas hijos. El resultado es que el núcleo de padres ha dado lugar a dos núcleos hijos idénticos. Para simplificar, sólo un par de cromosomas homólogos se muestra, un miembro de la pareja es de color rojo, el otro es azul.

La meiosis se presenta únicamente en las células germinales e inicia con una célula diploide que da lugar a 4 gametos haploides. Cada uno de los cuales puede subsecuentemente fusionarse con el gameto del sexo opuesto durante la reproducción sexual. El hecho de que la meiosis produzca cuatro células haploides mientras que la mitosis da lugar a dos células diploides es fácil de explicar: La meiosis consiste de dos divisiones celulares, una después de la otra; mientras que la mitosis es solo una división nuclear. La diferencia más importante entre mitosis y meiosis es que en una célula diploide existen dos copias separadas de cada cromosoma. Conocido como **cromosomas homólogos**. Durante la mitosis, los cromosomas homólogos permanecen separados uno de otro, cada miembro del par replica y es transmitido a un nuevo núcleo independientemente de su homólogo. (Figura 17) En meiosis, sin embargo, el par de cromosomas homólogos no son independientes. Durante la profase I, cada cromosoma se alinea con su homólogo para formar un bivalente. Esto ocurre después de que cada cromosoma se ha replicado. Pero antes de que la replicación ocurra, el bivalente de hecho contiene cuatro copias del cromosoma, cada una de las cuales está destinada a encontrar su camino en uno de los cuatro gametos que se producirán al final de la meiosis. Con el bivalente, los brazos del cromosoma (**cromátidas**) pueden romperse físicamente e intercambiar segmentos de DNA. El proceso es llamado entrecruzamiento o recombinación.^{35, 36}

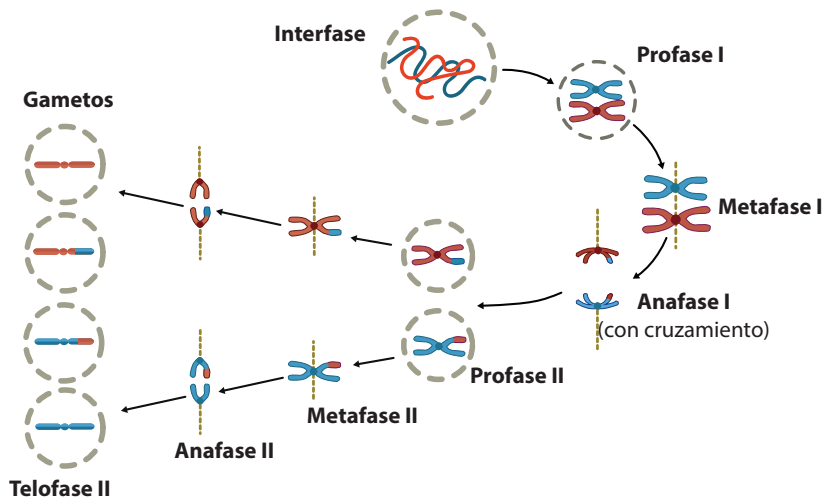


Figura 17.

Los acontecimientos relacionados con un par de cromosomas homólogos se mostrarán en uno de los miembros de la pareja: uno es de color rojo, el otro es azul

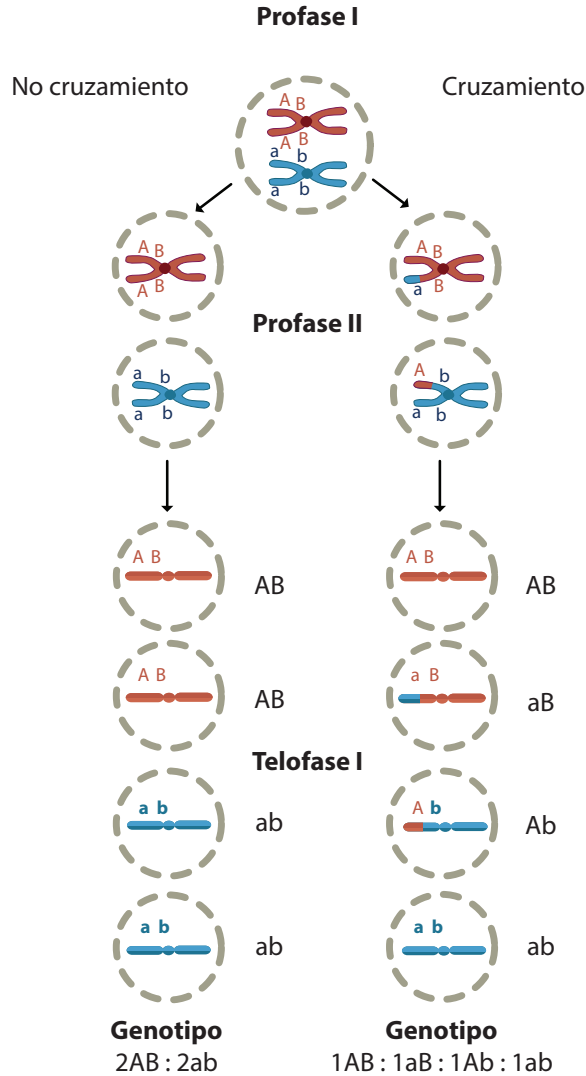


Figura 18.

El dibujo muestra un par de cromosomas homólogos, uno rojo y otro azul. A y B son los genes vinculados con los alelos A, B, A y B. A la izquierda hay una meiosis sin cruce entre A y B: dos de los gametos resultantes tienen el genotipo AB y las otras dos son ab. A la derecha, se produce un cruce entre A y B: los cuatro gametos muestran todos los genotipos posibles: AB, aB, Ab y ab.

Para entender como los entrecruzamientos explican el ligamiento parcial, es necesario pensar sobre el efecto que tiene el entrecruzamiento sobre la herencia de los genes. Si consideramos 2 genes, cada uno de los cuales tiene dos alelos. El primer gen se le denominará A con los alelos A y a, y el segundo gen B con los alelos B y b. Si imaginamos que los dos genes están localizados en el cromosoma numero 2 de *Drosophila melanogaster* y seguimos la meiosis de un núcleo diploide, en el cual una copia del cromosoma 2 tiene los alelos A y B, y la segunda tiene a y b.

Consideremos dos escenarios

- a) Un cruce no se presenta entre los genes A y B. Si esto pasa entonces, de los dos gametos resultantes, uno contendrá copias del cromosoma con los alelos A y B, y el otro, con los alelos a y b. Es decir uno de los gametos tendrá el genotipo AB; el otro, tendrá el genotipo ab.
- b) Un cruce se presenta entre los genes A y B. Esto conduce a segmentos de DNA conteniendo el gen B que ha sido intercambiado entre cromosomas homólogos. El resultado de cada gameto tendrá un fenotipo diferente, un genotipo AB, otro aB, el siguiente Ab y uno ab.

Si vemos los resultados de las meiosis de cien células idénticas. Si los entrecruzamientos nunca ocurren entonces los gametos resultantes tendrán los siguientes fenotipos:

200 AB
200 ab

Esto es un ligamiento completo: genes A y B se comportan como una unidad durante la meiosis. Pero si se presenta entrecruzamiento entre A y B en alguno de los núcleos, entonces los pares de alelos no serán heredados como una unidad simple. Si el entrecruzamiento ocurre en 40 de 100 meiosis, se producirán los siguientes gametos:

160 AB
160 ab
40 Ab
40 aB

En este caso el ligamiento no es completo solo parcial, ya que además de los genotipos paternos (AB, ab); también se presentan gametos con genotipos recombinantes. (Ab, aB). (Figura 18)

Del ligamiento parcial al mapeo genético

Una vez que se ha comprendido que el ligamiento parcial puede ser explicado por entrecruzamiento en la meiosis, se puede asignar una posición a los genes dentro del cromosoma. Un estudiante de Morgan, Arthur Sturtevant asumió que el entrecruzamiento fue un evento aleatorio, que tenía la misma posibilidad de presentarse en cualquier posición entre un par de cromátidas alineadas. Si esto es correcto, entonces dos genes que están distantes uno de otro serán separados por entrecruzamiento con mayor frecuencia que los que están en una posición más cercana. Por otra parte, la frecuencia en la cual los genes no están unidos por entrecruzamientos es directamente proporcional a la cercanía en la que estén en el cromosoma. La frecuencia de recombinación es la medida de la distancia entre dos genes. (Figura 19)

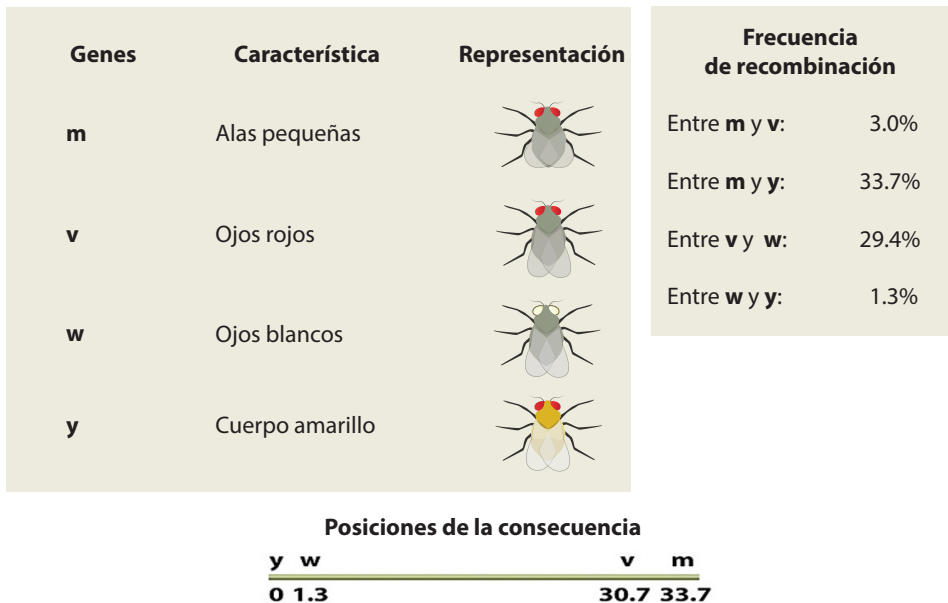


Figura 19.

Arthur Sturtevant trabajó con un mapa de recombinación de frecuencias. Existen cuatro genes en el cromosoma X de la mosca de la fruta. Se esquematizan las frecuencias de recombinación.

Distancia Genética de un *loci*

El mapeo de ligamiento está basado en asumir que la posibilidad de entrecruzamiento entre dos *loci* es proporcional a su distancia física. Esto involucra a la frecuencia de recombinación, el número de individuos en el mapeo de una población llega a ser un factor crítico. El segundo factor crítico es la presencia de doble entrecruzamiento. La probabilidad de recombinantes dobles es proporcional al cuadrado de la distancia de recombinación entre dos *loci*. Además hay que tomar en cuenta en el ajuste, la fracción de recombinación a unidades centi Morgan (cM). Los dos frecuentemente usan algoritmos para ajustar las funciones del mapeo genético descritas por Haldane (1919) y Kosambi (1944). La mayoría de los programas de mapeo genético están equipados con este tipo de conversión. El número óptimo de individuos necesarios para un mapeo genético dependen de varios factores, principalmente el nivel de resolución deseada, disponibilidad de mano de obra y el tiempo. Alrededor de 1-5 cM intervalos de marcaje han sido obtenidos en varios mapas genéticos primarios usando entre 50-100 individuos.

La frecuencia de recombinación puede variar debido a la genética, epigenética y factores ambientales. El entrecruzamiento se sabe que se reducirá en regiones cercanas al centromero y en segmentos invertidos. La reorganización en un genoma frecuentemente involucra rearrreglos estructurales que dirigen la especiación. Esto puede ser ejemplificado a partir de la inversión de los cromosomas, produciendo nuevas variedades en *Drosophila* por genética clásica y el reordenamiento de especies de cereales relacionados de forma cercana, que fueron aclarados recientemente por marcadores moleculares.

Ligamiento genético en programas de mejoramiento

La clave para el mapeo genético es ser capaz de determinar los genotipos de los gametos producto de la meiosis. En pocos casos es posible hacerlo por un examen directo de los gametos, por ejemplo, los gametos producidos por algunos eucariotes microbianos, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; las cuales pueden crecer en colonias de células haploides, en las que los genotipos pueden ser determinados por pruebas bioquímicas. La genotipificación directa de eucariotes superiores puede ser posible si se utilizan marcadores de DNA, como RFLP's, Microsatélites y SNP's. Esto es llevado a cabo por la determinación de los genotipos de la progenie diploide que es producto de la fusión de dos gametos, uno de cada par de progenitores.

Una complicación que se presenta con los cruces genéticos es que la progenie diploide resultante son producto de dos meiosis (uno de cada padre) y la mayoría de los organismos con eventos de entrecruzamientos tienen la misma probabilidad de presentarse durante la producción de gametos masculinos o femeninos. El procedimiento estándar es usar una cruce de prueba. La función crítica de los cruzamientos de prueba es conocer el genotipo de los progenitores. (Figura 20)

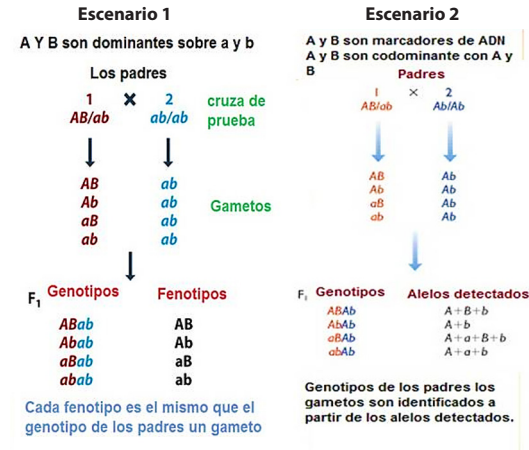


Figura 20.

Dos ejemplos de pruebas cruzadas: En el escenario 1, A y B son marcadores con alelos A, a, B, b. La descendencia producida fue evaluada al examinar sus fenotipos. Debido a que el progenitor 2 es homocigoto recesivo, no contribuye al fenotipo de la descendencia. En el escenario dos los progenitores tienen alelos codominantes

Interpretación de un mapa de ligamiento genético

Un mapa de ligamiento genético es útil para obtener información acerca de la naturaleza del genoma, de su organización y reorganización. El agrupamiento de *loci* marcadores podría indicar que se encuentran cerca del centromero. Mapeando un grupo de marcadores con situación preferencial en un sitio del genoma, es una evidencia de que está relacionado con adaptaciones biológicas. La detección de *loci* duplicados en agrupamientos, puede indicar que el genoma se reorganizó debido a una aberración cromosómica. Cuando las duplicaciones son frecuentes, particularmente en *loci* detectados con sondas de cDNA o genes clonados, esto puede ser un indicio de poliploidía.

La cobertura óptima de un mapa genético

En ocasiones se considera que dos o más mapas genéticos de la misma especie o especies muy relacionadas tienen distancias diferentes. Esto plantea la pregunta de cuándo un mapa debe de ser considerado completo. La descripción de grupos de ligamiento del mismo número cromosomas haploides y la ausencia de muchos marcadores no relacionados, es el principal criterio para asumir que el mapa genético está completo. Un organismo con un genoma pequeño y reducido número de cromosomas, tendrá una distancia más corta y requiere menor número de marcadores para cubrir el total de los cromosomas. La recombinación promedio entre un *loci* marcador, es otro criterio para tener en cuenta. En general, una recombinación del 5% con menor rango de variación es óptima. La tendencia de un marcador para mostrar una relación con los marcadores de otro ligamiento es obviamente una señal negativa.

Aplicación de mapas genéticos

Un mapa genético proporciona información de interés fundamental, pero es también la plataforma para la aplicación de varias herramientas. Un mapa puede ser usado para localizar genes que controlan características simples heredadas y cuantificar características complejas., particularmente las que presentan interés en la agricultura, medicina, industria o desarrollo. Además, puede ser usado para posterior saturación de regiones de interés; para el mapeo comparativo entre dos o más taxa cercanamente relacionados y para mapas basados en la clonación de genes.

Detección de *loci* por características sencillas heredadas

Esto es generalmente llamado como un mapeo genético o asignación de *loci* a una característica cualitativa. La aplicación de esta estrategia es bastante simple. La expresión del fenotipo de un carácter está registrada en los individuos de una población; que se convierten en los genotipos en relación a cuál de los progenitores se parecen, siguiendo con el análisis de ligamiento con los datos del marcador disponible. En algunos casos la expresión fenotípica puede ser registrada usando datos métricos o puntajes. Para el mapeo del *locus* de un rasgo o característica, los datos cuantificados fenotípicamente y se convierten a formas discretas dependiendo del padre al que se asemeje. Seguido por un análisis de ligamiento de rutina.

Una técnica interesante pero simple es ahora conocida para el mapeo genético. Implica el etiquetado del primer gen fuertemente ligado a los marcadores, siguiendo el concepto de análisis de segregantes agrupados. (BSA). El DNA de individuos segregantes con dos fenotipos diferentes se agrupan en dos grupos y se utilizan para la detección RAPD's.

Detección de *loci* de caracteres cuantitativos (QTL)

Una de las contribuciones del mapeo genético es la posibilidad de la detección de regiones en el genoma que controlan características cuantitativas. Estos caracteres son muy complejos con baja o moderada heredabilidad. Estas características son controladas por poligenes o genes menores, cada uno con efecto pequeño. Los caracteres cuantitativos presentan variación continua con una distribución normal. La naturaleza de la función de los genes de estas características, son convencionalmente estudiados por el uso de enfoques biométricos, aplicando varios modelos que implican muchos supuestos. La mayoría de estos supuestos son difíciles de comprobar.

Actualmente es posible estudiar la correlación de datos de características fenotípicas de individuos segregantes de una población con sus datos de marcadores para indicar los lugares en el genoma que controlan un carácter específico. El concepto de mapeo por intervalo para la detección de QTL's usando mapas completos, ha llegado a ser una estrategia popular para el mapeo de poligenes. Actualmente están disponibles excelentes programas para mapeo QTL. De estos el programa más ampliamente usado es el MAPMARKER/QTL 1.1. En este programa la probabilidad de una posición es determinada por un escaneo del total del genoma.

El programa proporciona mucha información genética además de la localización cromosómica de un grupo de genes. Esto proporciona el grado de probabilidad de la presencia de un QTL, la contribución de los alelos paternos al QTL; la extensión de la variación es explicada por QTL y la naturaleza de la acción de un gen, depende del mapeo de poblaciones (aditivo, dominante o recesivo).

Mapeo de alta resolución

En ciertos casos, los marcadores ligados están tan distantes de los *loci* de los caracteres, para monitorear los genes deseados por selección de marcaje

asistido (MAS). Esto hace necesario detectar los marcadores fuertemente ligados por MAS. La estrategia que se sigue en la mayoría de los casos, implica el uso de un marcador que flanquee el gen o el QTL y el desarrollo de una población segregante, únicamente en el área alrededor del gen/grupo de genes de interés, cercanos a las líneas isogénicas (NIL's) de mejora convencional y enriqueciendo el área con más marcadores. Los marcadores RAPD's y AFLP han sido ampliamente utilizados para este propósito. La población en la mayoría de los casos presenta variación discontinua para el mismo carácter cuantitativo y un simple *locus* puede ser detectado. Las características complejas pueden ser solucionadas dentro de un *locus* discreto y la estrategia se llama popularmente Mendelización.³⁷

Mapeo comparativo

Estudios sobre la relación entre evolución y filogenética basada en las similitudes y diferencias entre taxa relacionados de forma cercana (sub-especie, especies y genero) son una herramienta muy usada en las ciencias naturales. Esto tiene importancia fundamental para tener información sobre el origen genético y la ruta evolutiva de plantas y animales. En la mejora clásica, muchos caracteres han sido introducidos en plantas domesticadas de especies y géneros relacionados, incluso sin tener ninguna información de los genes involucrados. Para este propósito, es necesario conocer la información sobre el comportamiento de los cruces relacionados a la proximidad citológica y fertilidad. Tradicionalmente, similitud y diferencias entre taxa han sido estudiados usando principalmente atributos morfológicos, citológicos y biométricos. Con la Biología Molecular ahora se puede obtener esa información con exactitud sobre similitud de las regiones cromosómicas de dos o más taxa. Una gran cantidad de información se ha acumulado en este aspecto en las últimas dos décadas.

El mapeo comparativo facilita este tipo de estudios, comparando la homología del genoma entre dos taxa. Varios estudios han demostrado que los taxones estrechamente relacionados, contienen muchas relaciones con genes similares y altamente conservados, con solo un pequeño número de rearrreglos estructurales; la mayoría de ellos debidos a inversiones y translocaciones.³⁸

La construcción de mapas de ligamiento por mapeo comparativo se realiza aplicando un grupo de marcadores genéticos ortólogos, que garanticen que las sondas de DNA puedan detectar un *locus* en el genoma. Esto es porque las sondas de cDNA son las más adecuadas para mapeos comparativos. Es bien

conocido que una secuencia de DNA evoluciona lentamente en comparación con el DNA repetitivo intergénico.

El método más común para construir mapas, es el uso de cDNA's para detectar RFLP's en una región del cromosoma. Otra alternativa potencial es el uso de CAP's desarrollados a partir de cDNAs. Estos pueden ser usados tanto en genes ortólogos como en regiones conservadas. Los Microsatélites o SSR's también pueden ser utilizados en los dos casos, pero con menos frecuencia que la comparación por medio de RFLP's y CAP's. Teóricamente los marcadores basados en PCR como RAPD, AFLP han sido desarrollados con el objetivo de detectar múltiples *loci*, y esto baja su eficiencia en el mapeo comparativo de los genomas.

El mapeo comparativo ha sido usado en todas las clases de cultivos que presentan todos los niveles de ploidía. Esto ha puesto de manifiesto genes conservados, aunque marcados por reordenamientos cromosómicos menores, duplicación de genes o regiones del genoma en maíz, caña de azúcar, algodón y tubérculos; a la vez de similitud en taxones relacionados como en variedades de frijol, tomates y papas. En la familia poaceae se han encontrado un amplio repertorio de genes conservados.^{39, 40, 41,42} También se ha demostrado que la familia de pastos está formada de un único sistema de genes.⁴³

La detección de QTL's controlando las características poligénica en mapas de marcadores ortólogos ha abierto un nuevo camino para estudiar homología entre taxones. La localización de QTL para tamaño de semillas, desgrane y comportamiento de floración se han comparado en sorgo, caña de azúcar, maíz, trigo, cebada y arroz. Esto también incluye QTL para altura y floración en maíz, caña de azúcar y pastos. Producción de semillas a bajas temperaturas, tiempo de floración, sobrevivencia al invierno, y tolerancia al congelamiento se ha determinado en diferentes especies de *Brassica*.

El mapeo comparativo de las regiones con QTL's ha dilucidado algunos aspectos básicos evolutivos. Se ha encontrado que un *locus* que controla las características cualitativas de floración en *Arabidopsis*, es homólogo a los que controlan la producción de semillas a bajas temperaturas y la respuesta al tiempo de floración en *Brassica rapa*⁴⁴ y granos en maíz; claramente indica la tendencia evolutiva de grupos de genes y evidencias de duplicación cromosómica en miles de años, previo a la domesticación de estos cultivos.

La homología entre genes o grupos de genes, tiene implicaciones prácticas. Cultivares cercanamente relacionados únicamente difieren en unos pocos genes.

Por lo cual, es posible aislar los genes únicos para ser utilizados en la comprensión de la genética de cultivos relacionados. La información sobre roedores y otros animales domésticos también puede ser aplicada en la búsqueda y clonación de QTLs en humanos. Los mapeos comparativos por lo tanto tienen actualmente un gran impacto en la agricultura y medicina.

Mapeo físico

Un mapa generado por técnicas genéticas, en pocas ocasiones es suficiente para dirigir la fase de secuenciación de un genoma. Esto se debe a dos razones:

- a) La resolución de un mapa genético depende del número de entrecruzamientos que han sido documentados. Esto no es un problema grande en genomas de microorganismos porque estos pueden obtenerse en una gran cantidad, lo cual permite estudiar muchos entrecruzamientos, produciendo un detallado mapa genético. El problema con humanos y en la mayoría de los eucariotes es la imposibilidad de obtener un gran número de descendientes, por lo que pocas meiosis pueden ser estudiadas y para resolver la fuerza de los análisis de ligamiento es limitado.
- b) Los mapas genéticos tienen una exactitud limitada.

Estas dos limitaciones en el mapeo genético significan que en la mayoría de los eucariotes un mapa genético debe ser revisado y completado por procedimientos alternativos antes de la secuenciación a gran escala de DNA. Se han desarrollado varias técnicas para el mapeo físico para solucionar este problema, las técnicas más importantes son:

- a) Mapeo de restricción: El cual localiza las posiciones relativas en una molécula de DNA para reconocer las secuencias por medio de enzimas de restricción.
- b) Hibridación fluorescente in situ (FISH), en el cual la localización de marcadores son mapeados por hibridación con una sonda conteniendo el marcador para un cromosoma intacto.
- c) Mapeo por etiquetado de secuencia, en el cual la posición de una secuencia corta es mapeada por examen de las colecciones de fragmentos de DNA genómico por PCR y/o análisis de hibridación.³⁵

Mapeo de restricción

El mapeo genético usando RFLP's como marcador molecular puede localizar la posición de un sitio polimórfico dentro de un genoma, pero muy pocos sitios de restricción en el genoma son polimórficos; por lo que muchos sitios no pueden ser mapeados con esta técnica. También es posible incrementar la densidad del marcaje sobre un genoma, usando un método alternativo para localizar la posición de algunos sitios de restricción no polimórficos. Esto se puede lograr con un mapeo de restricción, aunque en la práctica la técnica tiene la limitación que es únicamente aplicable a moléculas de DNA relativamente pequeñas.

Hibridación fluorescente in situ (FISH)

La hibridación *in situ* es la versión del análisis de hibridación, en el cual un cromosoma intacto es examinado por una sonda, con una molécula de DNA etiquetado. La posición sobre un cromosoma en el cual la hibridación se presenta, proporciona información sobre la localización de una secuencia de DNA usada como sonda. Para este método el DNA debe de ser desnaturalizado para separar las dos cadenas de DNA, con la posterior hibridación del DNA con la sonda. En las primeras versiones de la hibridación *in situ* la sonda era radioactivamente etiquetada, pero este procedimiento no era totalmente satisfactorio porque con el marcaje radiactivo, era difícil tener sensibilidad y resolución, dos requerimientos críticos para una hibridación *in situ* exitosa. Este problema se solucionó al desarrollarse una sonda no radioactiva marcada con fluorescencia.

Mapeo por etiquetado de secuencia

Para generar un mapa físico detallado de un genoma grande, es necesario, idealmente un mapeo de alta resolución que sea rápido y no técnicamente demandante. Ninguna de las técnicas anteriores cumple con estos requerimientos. Los mapeos de restricción son rápidos, fáciles y proporcionan información detallada, pero no pueden ser aplicados a grandes genomas. FISH puede aplicarse a grandes genomas y versiones modificadas como FISH-fibroso, pueden proporcionar datos de alta resolución, pero FISH es difícil de llevar a cabo y la acumulación de datos es lenta, con un mapa de posiciones no más de tres o cuatro marcadores pueden obtenerse en un solo experimento. Por lo que una técnica más fuerte es necesaria.

Actualmente la técnica más poderosa para el mapeo físico, es la que ha sido responsable de la generación de los mapas más detallados de genomas grandes, esta es el mapeo por etiquetado de secuencia o STS, este es una técnica sencilla (Figura 21).

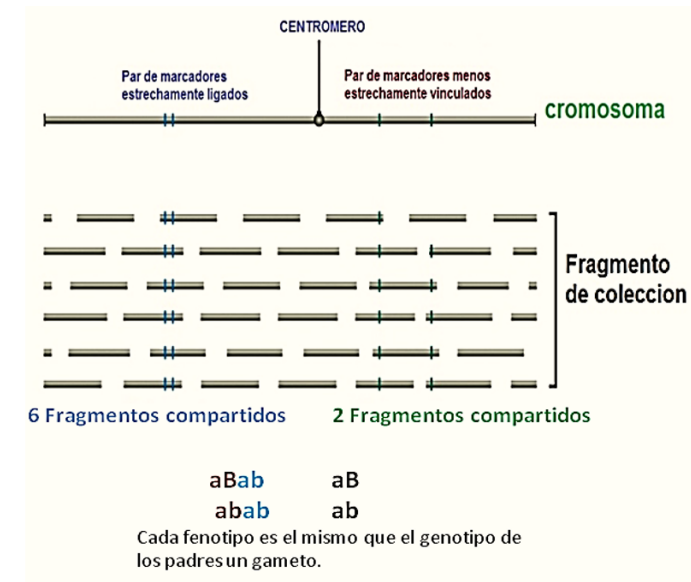


Figura 21.

Un grupo de fragmentos disponibles para mapeo.

Los mapas genéticos proporcionan el preámbulo para los proyectos de secuenciación porque indican la posición de los genes y otras características reconocidas y por lo tanto permiten exactitud en el ensamblado de la secuencia de DNA a ser estudiada. Los mapas genéticos se construyen por experimentos de entrecruzamientos y análisis de genealogía y los mapas físicos por el examen directo de la molécula de DNA.

En el primer mapa genético, los marcadores fueron genes cuyos alelos podrían ser distinguidos porque ellos producían un fenotipo determinado como diferente color de ojos, o cuyos alelos podían ser distinguidos por pruebas bioquímicas. Actualmente los marcadores de DNA son ampliamente utilizados, estos incluyen el Polimorfismo de fragmentos largos de restricción (RFLP's), y polimórfico de nucleótido simple (SNP's), los cuales pueden ser tipificados rápidamente por PCR. La posición relativa de los genes y los marcadores de DNA

sobre el cromosoma son determinados por análisis de ligamento. Esta técnica está basada sobre los descubrimientos originales de Mendel y fue inicialmente desarrollada para ser usada con moscas de la fruta. Los análisis de ligamento habilitan la frecuencia de recombinación entre un par de marcadores para ser determinados, proporcionando información necesaria para deducir la posición relativa de los marcadores sobre el mapa genético. Para muchos organismos, los análisis de linaje se llevan a cabo siguiendo la heredabilidad de marcadores en experimentos de mejora, pero eso no se puede llevar a cabo en humanos. En lugar de esto, el mapeo genético en humanos depende del análisis de marcadores heredados en grandes familias, un procedimiento llamado análisis de genealogía. Los mapas genéticos tienen relativamente poca resolución y tienden a ser inexactos y deben de ser refinados con el mapeo físico si el mapa va a ser usado en el proyecto de secuenciación de un genoma. La posición de un sitio de restricción en una pequeña molécula de DNA puede ser determinada por un mapeo de restricción, pero está limitado en eucariotes. De gran utilidad es el mapeo fluorescente *insitu*, en el cual se determina una posición en el DNA, usando una sonda marcada con fluorescencia; la posición en la cual la hibridación se presenta es analizada por medio de 8'. Los mapas físicos más detallados se obtienen por medio del etiquetado de una secuencia, la cual hace uso de un mapeo reactivo, una colección de fragmentos de DNA traslapados en un cromosoma o genoma. Este mapeo es determinado por la identificación de cual fragmento en la colección contiene copias del marcador.

Bibliografía

- VENTER J.C., Adams M.D., Myers E.W., et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001; 291: 1304- 51.
- WATSON J.D. “The Human Genome Project: Past, Present and Future”. *Science*. 1990; 248: 44-48.
- HOULE D., Govindaraju D.R., Omholt S. Phenomics: the next challenge. *Nature Rev. Genet*. 2010; 11:855-66.
- FERNANDEZ-RICAUD L., Warringer J., Ericson E., Glaab K., Davidsson P., Nilsson F., et al. PROPHECY—a yeast phenome database, update 2006. *Nucleic Acids Res*. 2006; 35:463-67.
- TIAN C., Chikayama E., Tsuboi Y., Kuromori T., Shinozaki K., Kikuchi J., et al. Top-down Phenomics of *Arabidopsis thaliana*: Metabolic profiling by one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy and transcriptome analysis of albino mutants. *J. Biol. Chem.* 2007; 282(25):18532-41.
- VENKATESH B., Kirkness E.F., Loh Y.H., Halpern A.L., Lee A.P., Johnson J, Dandona N, et al. Survey sequencing and comparative analysis of the elephant shark (*Callorhynchus milii*) genome. *PLoS Bio*. 2007; 5(4): 932-44.
- JAILLON O., Aury J.M., Brunet F., Petit J.L., Stange-Thomann N., et al. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature*. 2004; 431: 946–57.
- CHURCH D.M., Goodstadt L., Hillier L.W., Zody M.C., Goldstein S., She X., et al. Lineage-Specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Bio*. 2009; 7(5): 1-16.
- Mikkelsen T.S., Hillier L.W., Eichler E.E., Zody M.C., Jaffe D.B., Yang S., et al. The Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium. *Nature*. 2005; 437: 69-87.
- BILDER R.M., Sabb F.W., Cannon T.D., London E.D., Jentsch J.D., Stott Parker D., et al. Phenomics: the systematic study of phenotypes on a genome-wide scale. *Neuroscience*. 2009; 164: 30–42.

- KOKEL D., Peterson R.T. Chemobehavioural phenomics and behaviour-based psychiatric drug discovery in the zebrafish. Briefings in functional genomics and proteomics. 2008; 7 (6): 483-90.
- FREIMER N., Sabatti C. "The human phenome project". *Nature Rev Genet.* 2003; 34: 15-21.
- GOVINDARAJU D.R., Cupples L.A., Kannel W.B., O'Donnel C.J, Atwood L.D., D'Agostino R.B., et al. Genetics of the Framingham Heart Study population. *Adv Genet.* 2008; 62: 33-65
- BILDER R.M., Sabb F.W., Stott Parker D., Kalar D, Chu W.W., Fox J., Cognitive ontologies for neuropsychiatric phenomics research. *Cognitive Neuropsychiatry.* 2009; 14 (4/5), 419-50
- East A. Mendelian interpretation of variation that is apparently continuous. *American Naturalist* 1910; 44: 65-82\ East. Studies on size inheritance in *Nicotiana* *Genetics* 1916;1:164
- YUANFANG G., Ackert-Bicknell C., Kell B., Troyanskaya O., Hibbs M. Functional Genomics Complements Quantitative Genetics in Identifying Disease-Gene Associations. 2010; 6(11): 1-11.
- Mapping Environment-Specific Quantitative Trait Loci. *Genetics.* 2010; 186(3): 1053-1066.
- BRADSHAW H.D., Otto K.G., Frewen, B.E., McKay J., Schemske D. W. Quantitative Trait Loci Affecting Differences in Floral Morphology Between Two Species of Monkeyflower (*Mimulus*). *Genetics.* 1998; 149:367-382
19. Bell A.E. Heritability in retrospect.1977; *The Journal of Heredity* 68:297-300.
- AKERBERG E. Nilsson-Ehle and the development of plant breeding at Svalof during the period 1900-1915. 1986, *Hereditas.* 105; 1-5.
- LYNCH M., Walsh B. *Genetics and analysis of quantitative traits.* 1998;Sunderland, M.A: Sinauer.
- HARTL D.,L., Jones E.W. *Genetics: Principles and analysis.*1998. Jones and Barlett Publishers. Inc.
- RUSELL, P. *Genetics a Molecular Approach.* 2010. Pearson Education.
- JAIN, H.K., Kharkwal M.C., *Plant Breeding Mendelian and Molecular Approaches.*2004. Narosa Publishing House.
- PARAN I., y Zamir D. Quantitative traits in plants: beyond the QTL. 2003. *TRENDS in Genetics.* Vol.19 No.6; 303-06.

- COSTER, A., Bastiaansen J.M., Calus M.L., Van Arendonk J.A., Bovenhuis, H. Sensitivity of methods for estimating breeding values using genetic markers to the number of QTL and distribution of QTL variance. 2010. *Genetics Selection Evolution* 42:9
- GODDARD, M.E., Hayer, B.J.. Genomic selection. 2007. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 124(6):323-30.
- ROBIN C., Lyman R.F., Long A.D., Langley C.H. y MacKay, T.C. hairy: A quantitative trait locus for *Drosophila* sensory bristle number. 2002. *Genetics* 162:155-64.
- MORGAN, T.H. Sex-linked inheritance in *Drosophila*. *Science*. 1910. 32:120-122.
- MARKERT C.L., Moller F., Multiple forms of enzymes; tissue, ontogenic, and species-specific patterns. 1959. *Proceeding of the National Academic of Sciences. USA*. 45:753-63.
- TANKSLEY, S.D., Orton, T.J. *Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Parts 1A y 1B*. 1983. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- BOTSTEIN D., White, R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. 1980. *American Journal of Human Genetics*. 32(3):314-31.
- MULLIS K., Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 1987. 155: 335-51.
- MULLIS K., Faloona F., Scharf S., Saiki R.K., Horn G., Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. 1986. *Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology*. 51:263.
- BROWN T.A. *Genomes 3*. 2007. Garland Science Publishing.
- GRIFFITHS A.J., Gelbart W.M., Miller J.H. *Modern Analysis Genetics*. 1999. WPaterson A.H., Lander E.S., Hewitt J.D., Peterson S., Lincoln S.E., Tanksley S.D. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete RFLP linkage map. 1988. *Nature*, 335:721-26.
- PATERSON A.H., Bowers J.E. Comparative genomics Plant chromosome. 2000. *Plant Cell*, 12:1523-39.
- HULBERT SH., Richter TE., Axtell JD., Bennetzen J.L. Genetics mapping and characterization of sorghum and related crops by means of maize DNA probes. 1990. *Proceedings of National Academic of Science. USA*, 87:4251-55.
- AHN S., Tanksley S.D. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. 1993. *Proceedings of the National Academic of Science. USA*, 90:7980-84.

- AHN S., Anderson JA., Sorrells M.E., Tanksley SD. Homeologous relationships of rice, wheat, and maize chromosomes. 1993. *Molecular Genetics and Genomics*. 241:483-90.
- KURATA N., Moore G., Nagamura Y., Foote T., Yano M., Minobe Y., et al. Conservation of genome structure between rice and wheat. 1994. *Biotechnology*, 12:276-78.
- BENNETZEN JL., Freeling M. Grasses as a single genetic system: genome composition, clonarity and compatibility. 1993. *Trends Genetics*.9: 259-61.
- KOLE C., Quijada P., Michaels AD., Amasino R., Osborn TC. Evidence for homology of flowering time genes VFR2 from *Brassica rapa* and FLC from *Arabidopsis thaliana*. 2001. *Theoretical and applied genetics*. 102:425-430.

Genómica forense

Mauro López Armenta

Introducción

Las Ciencias Forenses comprende un cúmulo de áreas especializadas que ayudan a jueces y jurados a solucionar problemas legales, el objetivo en todos los casos es que la procuración e impartición de justicia sea imparcial, pronta y expedita. El ejercicio de la justicia no es una tarea fácil en vista de lo variado que pueden ser los delitos y las situaciones en que se suscitan, no será difícil imaginar que el campo de las Ciencias Forenses sea en consecuencia de un espectro muy amplio al que se incorporan continuamente nuevas disciplinas. Una de las disciplinas de reciente incorporación que ha revolucionado las investigaciones forenses durante las últimas dos décadas es la Genética, y es gracias a ella que se pueden resolver casos que de otra forma serían imposibles.

La Genética Forense como es que se le conoce a la Genética cuando se desarrolla en un marco legal manifiesta su éxito al resolver casos en donde se establece la relación independiente o conjunta entre víctima, victimario y lugar de los hechos, siempre a través de la identificación de muestras biológicas, muchas en cantidades demasiado pequeñas y/o dañadas, en otros casos, muestras almacenadas durante años.

El principio al que recurre la Genética Forense es simple y parte de unas cuantas premisas, la primera de ellas contempla que todas las formas de vida están compuestas de células, segunda; que todas las células llevan en su interior DNA, tercera; el DNA es único para cada individuo y por tanto, diferente entre un individuo y otro y cuarta; que siempre existe un vínculo entre individuos emparentados biológicamente como consecuencia natural de sus caracteres heredados y que puede variar en mayor o menor medida según su relación filial. La Genética Forense en consecuencia puede aportar pruebas sobre la relación existente entre un indicio biológico (nombre con que se refiere una muestra

biológica asociado a un hecho delictivo en vías a ser analizada y comprobada su relación con el acto criminal) y el o los presuntos responsables, que no son sino los individuos ubicados en tiempo y espacio junto con la actividad delictiva de la que se busca impartir justicia al lindar responsabilidades.

En la Genética Forense existen caso espectaculares donde un delito es resuelto al identificar al criminal mediante una fibra pilosa, una gota de sangre, semen o saliva, o mediante las células recuperadas de la boquilla de un cigarro, un sombrero, o los lentes dejados en el lugar del crimen, en otros casos ha sido posible resolver casos criminales a través de las células recuperadas de estampillas y sobres postales, y no menos espectacular ha sido la identificación de delincuentes que han modificado su apariencia mediante algún tipo de intervención quirúrgica con objeto de burlar la autoridad.

Las aplicaciones de la Genética Forense no sólo están confinadas al ámbito legal, también tiene utilidad en procesos civiles, el reconocimiento o desconocimiento de parentesco en alegatos de paternidad y herencias son claro ejemplo de ello, por otro lado, el impacto de la Genética Forense es contundente en el reconocimiento de cadáveres de personas fallecidas durante siniestros, trátese de tragedias cometidas en forma premeditada como ocurre en actos terroristas o generadas por accidentes como es el caso de incendios o desastres aéreos, del mismo modo, la Genética Forense tiene gran uso en la identificación de restos humanos que dejan los desastres naturales tales como temblores o tsunamis. La utilidad en todos los casos se da cuando el cadáver o restos de una persona no pueden ser identificados mediante métodos tradicionales en los que se hace uso de credenciales de identificación personal, tatuajes, cicatrices, traumatismos congénitos u otros rasgos invariables, algunos de los cuales suelen ser registrados en placas de rayos X como ocurre con los registros dentales o de fracturas óseas, por tanto, la utilidad que tienen las pruebas de DNA queda al margen del elevado grado de descomposición que un cadáver presenta o bien porque se trata de muestras demasiado pequeñas o fragmentadas, al grado que la reconstrucción e identificación del individuo resulta imposible de llevarse a cabo por cualquiera de los métodos señalados.

La aplicación de la Genética Forense es en todo caso, la identificación. Al principio realizada entre personas, luego entre animales, plantas e incluso entre microorganismos, lo que da lugar a una novedosa disciplina que por sus características se yergue independiente en algo que es llamado “Microbiología Forense”.

Sin embargo, aun cuando pueda ser de tan gran alcance el análisis del DNA, éste está lejos de ser la condición indispensable en los estudios de casos forenses. La evidencia que da el DNA se debe considerar siempre en el marco de otra evidencia más de entre los muchos tipos de indicios que pueden ser encontrados en la escena de un crimen, de modo que el papel del genetista forense no será el hacer presunciones de la culpabilidad o inocencia de un presunto responsable, sino de proporcionar información imparcial a jueces y jurados.

Antecedentes

La evolución que tienen el estudio de DNA en materia de Genética Forense y que hace que esta disciplina se convierta en parte fundamental de los actuales casos forenses, es la sensibilidad de sus técnicas, en principio, sus métodos de extracción y purificación de ácidos nucleicos así como el uso de la técnica de PCR (también conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa), que permite el análisis de muestras en cantidades extremadamente pequeñas, algunas veces llamadas “mínimas críticas” debido a que están compuestas tan sólo de algunos cuantos miligramos o mililitros de material biológico, y que puede verse reducido a fin de cuentas a tan sólo algunas decenas de células que en algunos casos, no superan siquiera el centenar, pero que son suficientes para la generación de resultados exitosos, en consecuencia, identificar y/o correlacionar personas relacionadas con actos criminales.

El tipo de marcadores moleculares es otra de las causas que hacen de la Genética Forense una poderosa herramienta, su diseño está ideado para su detección en muestras muy degradadas, y más aún, puedan ser analizados de forma múltiple en un número tan significativo de marcadores que la probabilidad de encontrar dos individuos con las mismas marcas genéticas sea tan pequeña, que sería necesario superar muchas veces el tamaño de la población actual del planeta.

Métodos de extracción

Cuando se habla de Genética Forense suele hacer hincapié de los tipos y variedad de marcadores moleculares empleados en su práctica, dejando de lado las técnicas de extracción sin las cuales no sería posible su caracterización.

Ya desde el descubrimiento del DNA por Johann Friedrich Miescher las técnicas de extracción resultaron fundamentales para sus estudios. En 1869,

estudiando la composición química de los linfocitos Miescher desarrolló una técnica consistente en el uso de una solución salina que permitía la lisis de células leucocitarias obtenidas de vendajes purulentos, aun cuando desconocía la naturaleza de muchos compuestos celulares, Miescher había concebido el primer método de lisis celular con objeto de estudiar su contenido, el interés que Miescher tenía sobre el núcleo de las células lo llevó rápidamente a perfeccionar su técnica y pronto puso a punta un método que empleaba alcohol caliente para lavar las células leucocitarias y lisar sus membranas eliminando la mayor parte del citoplasma, las proteínas del extracto eran entonces digeridos con pepsina de cerdo y los lípidos eliminados con éter y agua, al final, la masa nuclear era precipitada con alcohol para finalmente ser lavada con carbonato de sodio diluido. El método de extracción de la masa nuclear de Miescher fue repetido con mismos resultados empleando esperma de salmón, la masa nuclear o nucleína como él le llamaba era en realidad DNA puro. En los años que siguieron el método de extracción de DNA de Miescher basado en solventes orgánicos, fue perfeccionado hasta derivar en un método de extracción con múltiples variantes las cuales han sido empleadas en casi todos los laboratorios del mundo (1)

Extracción orgánica

El método de extracción orgánica mediante uso de fenol y cloroformo basado muy probablemente en los métodos de Miescher es la técnica de referencia empleada en cualquier laboratorio de Genética Forense, sin embargo, la “pérdida significativa” de muestra durante este proceso de extracción ha hecho que su práctica se encuentre en franco desuso. La “pérdida significa” de material que se comenta suelen ser de algunos nanogramos o picogramos de DNA, sin embargo esto es catastrófico si se considera que las muestras procedentes de indicios forenses constan de apenas eso, algunos nanogramos o picogramos de DNA. La técnica basada en el uso de fenol y cloroforma fue por mucho tiempo uno de los principales recursos, no sólo en los laboratorios de Genética Forense, sino prácticamente en todos la laboratorios del mundo dedicados a estudios de DNA. El uso del fenol y cloroformo como técnica de extracción si bien ha perdurado hasta nuestros días, es hoy una alternativa más entre otros métodos y técnicas de extracción.

El aporte de Miescher derivó también en el desarrollo de diferentes tipos de soluciones empleadas para la lisis de las células que pueden hallarse en un indicio biológico. Las soluciones de lisis son elementos importantes en las

técnicas de extracción, en general, compuestas de sales, algún detergente y cierto tipo de enzima proteolítica. Las soluciones de lisis por fortuna no fueron lo único que cambió, también lo hicieron las formas en que el DNA debía ser purificado. Habrían de pasar muchas décadas para que el desarrollo de técnicas radicalmente distintas fuera posible.

La dilucidación de la estructura del DNA en 1953 por James Watson y Francis Crick y el impulso que trajeron consigo los estudios de Biología Molecular, fue el desarrollo de técnicas innovadoras para el estudio de ácidos nucleicos, muchas técnicas como la PCR desarrollada en 1986 por Kary Mullis de la Corporación Cetus exigían no sólo alta pureza de DNA, también requerían de rapidez y agilidad, lo cual no era fácil de conseguir para los estándares de entonces.

Tarjetas FTA™

Durante la segunda mitad de los años 80 y como respuesta a las nuevas necesidades tecnológicas, Leigh Alexander Burgoyne de la Universidad de Flinders en Australia desarrolló una técnica de extracción consistente en el uso de papel. La técnica era simple, embeber papel filtro Whatman, común en muchos laboratorios, con una muestra biológica, principalmente líquida, como es sangre o saliva y luego obtener el DNA de las células que han quedado en ella mediante el uso de soluciones de lavado. La técnica fue rápidamente comercializada por Fiszco® y Whatman Co, de suerte que las tarjetas llamadas FTA (por Fitzco/Flinder Technology Agreement) fueron puestas a disposición corroborando su utilidad. Esta técnica tan simple había resultado una maravilla para muchos investigadores, sólo requería de algunos minutos, empleaba cantidades muy pequeñas y podía acoplarse directamente a PCR. Las virtudes de la nueva técnica no paraban, las tarjetas podían emplearse para la toma de muestra y ser almacenada sin requerimientos especiales por varios meses e incluso años sin que por ello la muestra y DNA contenido en la tarjeta sufriera de degradación alguna. (2)

El uso de la Sílica

A finales de los 80, la técnica de fenol y cloroformo seguía dominando los escenarios del DNA, pero un nuevo método habría de cambiarlo todo. En 1989 René Boom y colaboradores, del Centro Médico Académico de la Universidad

de Ámsterdam en Holanda reportaban el uso de sílica como parte de un método fácil y simple para la purificación de ácidos nucleicos basado en la afinidad que éstos tienen con la sílica, una forma granular de dióxido de silicio que se une a los ácidos nucleicos cuando se encuentran en presencia de sales caotrópicas y pH bajo (3). Las mejoras en esta técnica han derivado en los sistemas comerciales de columnas para la extracción y purificación de ácidos nucleicos de casi cualquier tipo de muestra.

Las técnicas de extracción con base en sílica fueron adoptadas rápidamente, implicaban procedimientos fáciles y menos laboriosos, requerían menor tiempo en sus prácticas con resultados óptimos cuanto a calidad y rendimiento en la extracción, pero lo mejor de todo era que no requerían el uso de sustancias tan tóxicas como el fenol, del que pronto se supo podía tener potencial carcinógeno en seres humanos.

Aunque el potencial de carcinogenicidad que el fenol puede tener en seres humanos es algo que todavía se debate, quedaba el hecho de que los usuarios de laboratorios forenses y de otros tipos de laboratorios preferían métodos más fáciles y seguros. En los años que siguieron novedosos métodos de extracción y análisis de DNA fueron desarrollados en vista de poder investigar todo tipo de muestra biológica.

Chelex

Otro gran logro con impacto significativo en la Genética Forense fue el uso de una resina de intercambio iónico con afinidad a iones metálicos polivalentes. La resina de características quelantes de nombre comercial Chelex 100 dado por la empresa Bio-Rad tuvo su aparición en 1991 cuando Sean Walsh y colaboradores, todos ellos del Departamento de Genética Humana de la Corporación Cetus, publicaron su uso para la extracción de DNA de muestras mínimas críticas con expreso uso forense. La resina Chelex 100 compuesta de grupos funcionales iminodiacético unidos a un copolímero de estireno divinil benceno, manifestaba ya su utilidad al secuestrar iones metálicos presentes en cuerpos acuosos contaminados. El uso del Chelex 100 en muestras biológicas implicaba que iones metálicos con función de cofactores de múltiples enzimas hidrolíticas, entre ellas DNAsas, liberadas luego de la muerte de las células, podían ser inactivadas, por lo que la degradación del DNA se detenía, hecho muy frecuente en restos de personas muertas hacia tiempo. La técnica de extracción con Chelex es quizá

una de las más simples, la muestra biológica, generalmente compuesta por algunos miligramos de material, es calentada o puesta a ebullición junto con el Chelex por pocos minutos, lisando con ello células y exponiendo el DNA, que es protegido al inhibir la acción de enzimas que pudieran haber resistido el calor (4) La extracción del DNA por este método llamada “extracción cruda” debido a que no elimina remanentes celulares fue bien acogida en los laboratorios de Genética Forense, ya que entre sus propiedades, estaba la captura de inhibidores de PCR, que suelen estar presentes en muestras forenses

DNA IQ

Otro método de extracción empleado con frecuencia y de reciente aparición es el sistema comercial DNA IQ™, comercializado por la Corporación Promega, que consiste en el uso de una resina con alta afinidad al DNA donde la unión es reversible al cambio de pH, la resina, unida a su vez a perlas magnéticas, es separada al interactuar con un imán que favorece la limpieza del DNA. La ventaja de este método no sólo está en la purificación, permite la cuantificación del DNA, debido a que la cantidad de resina empleada es proporcional a la cantidad de DNA que se une a ella, por si fuera poco el método puede acoplarse a estaciones robóticas de trabajo que evitan cualquier tipo de error humano, agilizando el ya de por sí rápido procesamiento.

Extracción diferencial

Aunque aparecen nuevos métodos de extracción, otros se han mantenido. Uno de los métodos más importantes y que se usan sin mayores cambios fue el desarrollado por Peter Gill y colaboradores del Servicio de Ciencias Forenses del Reino Unido en 1985. Su método, una versión modificada de la técnica de extracción orgánica, separa el DNA de células epiteliales y espermatozoides contenidos en muestras procedentes de delitos sexuales. El análisis de DNA es posible gracias a la resistencia que presentan los espermatozoides, quienes poseen proteínas ricas en puentes disulfuro y que a diferencia de las células epiteliales, ofrecen mayor resistencia a la lisis celular. El resultado es que las células epiteliales procedentes generalmente de la víctima son lisadas primero, los espermatozoides que han resistido son entonces lavados para eliminar el DNA de las células epiteliales que antes fueron lisadas. Finalmente, los espermatozoides son lisados con ayuda de un agente reductor que ayuda a liberar su DNA (5)

Los modernos laboratorios de Genética Forense acuñan múltiples métodos de extracción, las alternativas dependen del tipo de muestra que se trate, lo cual obra con base al hecho de que una muestra como parte de un indicio biológico es única y por lo tanto, requiere de un análisis según lo exigen sus características. Es así que el DNA de una muestra de hueso suele ser extraído de diferente forma que el DNA encontrado en un cabello, una gota de sangre o un tejido blando. Del mismo modo, la extracción de DNA puede variar según la cantidad de muestra y/o tipo de degradación que presente.

Marcadores de uso forense

Primeros marcadores genéticos

El desarrollo de la Genética Forense ha sido resultado del análisis de la variación genética humana. El estudio de la variabilidad comenzó hace no más de un siglo con Karl Landsteiner quien descubriera que existen diferencias en los grupos sanguíneos humanos, los cuales clasifiqué en un sistema que hoy se reconoce en todo el mundo como ABO (6). Landsteiner no tardó en advertir que esta variación podría ser empleada para solucionar crímenes. Desde entonces las pruebas con grupos sanguíneos han sido empleadas en casos forenses, aunque es hasta los años 40's que son aceptadas como evidencia oficial en una corte.

A pesar de la poca variabilidad del sistema ABO y el hecho de que no pudiera demostrar en forma concluyente que una muestra viene de una persona específica, su uso era requerido con frecuencia, si bien no podía indicar al dueño de la muestra, si podía decir de qué personas no era. El potencial de este tipo de exámenes es considerado actualmente como una prueba de exclusión. Quizá no sobre decir que el demostrar que una muestra procede de una persona en particular es aún más difícil, ya que depende del grado de variabilidad que puede exhibir un sistema de tipificación.

Hasta los años 80's, las pruebas empleadas para detectar variabilidad fueron las de tipo serológico, los ensayos consistían en analizar fluidos corporales, de los cuales la sangre era la más importante, ya que solía estar presente luego de cometido un delito. De los estudios sanguíneos en muestras procedentes de hechos criminales se determinaban, cuando era posible, los grupos sanguíneos y proteínas polimórficas, desafortunadamente las muestras se degradaban rápidamente o estaban en cantidades tan pequeñas que en muchos casos resultaba prácticamente imposible su estudio. Por otro lado, grupos sanguíneos

y proteínas no eran lo suficientemente variables, de suerte que el poder informativo era limitado, a pesar de que en muchos casos el análisis fuera hecho con varios sistemas. El resultado de probabilidad de que una persona tuviera un igual no relacionado biológicamente era muy alto, en el mejor de los casos, la probabilidad de empate podía ser de 1 en mil. Desafortunadamente el problema con este tipo de sistemas era mayor, la detección de ciertos marcadores, fueran grupos sanguíneos o proteínas variaba según el tipo muestra. En delitos sexuales, se tenía el problema de que algunos marcadores presentes en sangre no pudieran ser confrontados con los encontrados en semen o saliva y peor aún, los fluidos de la víctima y perpetrador solían estar casi siempre mezclados (7).

Huella genética de DNA por múltiples locus (DNA Fingerprints multilocus)

En 1980, Arlene R. Wyman y Ray White de la Universidad de la Escuela Médica de Massachusetts hacían un descubrimiento que habría de cambiar las Ciencias Forenses por siempre, habían descubierto el primer *locus* polimórfico no codificante (8). El descubrimiento de Wayman y White no pasó inadvertido, en 1984 Alec Jeffreys de la Universidad Leicester en Reino Unido, aplicaba ciertos *loci* polimórficos como marcas únicas de una persona en vista de que tales *loci* de tipo minisatélites variaban entre una persona y otra (9), nació la huella genética de DNA y con ella la Genética Forense

Los minisatélites, caracterizados por su número variable de repetidos en tandem o VNTR's (acrónimo de Variable Number of Tandem Repeats), podían ser detectados por autorradiografía luego del corrimiento electroforético e hibridación a través de Southern blots en DNA genómico digerido por enzimas de restricción que servía como sonda, método conocido como polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción o RFLP's (acrónimo de Variable Number of Tandem Repeats). Las secuencias compartidas entre los diferentes *loci* de los minisatélites permitían a las sondas detectar muchos minisatélites en forma independiente y simultánea, lo cual daba lugar a variados patrones de bandeo, que por ser únicos, Jeffreys denominó huellas digitales del DNA, más popularmente conocida como DNA fingerprints, (5, 10). El método de DNA fingerprinting de Jeffreys es también conocido como sonda multilocus o MLP's (acrónimo de multi-locus probes) o fingerprinting multilocus, dado detecta diferentes VNTR's de múltiples sitios en el genoma (11).

El poder estadístico que daba el método de DNA fingerprinting era apabullante cuando se comparaba con otros método de identificación de

muestras biológicas. Con el DNA fingerprinting la probabilidad para encontrar dos individuos con las mismas marcas o patrón de DNA era estimada hasta en 3×10^{-11} , mientras que dos sondas juntas incluso podían alcanzar un valor estimado de 5×10^{-19} , es decir, 1 en 30 000 millones para una sonda y 1 en 2 trillones cuando dos sondas eran empleadas (10). La probabilidad de empate era tan baja que los únicos individuos que podrían compartir huellas digitales de DNA serían gemelos monocigóticos.

Huella genética de DNA por un sólo locus (DNA Fingerprints unilocus)

El uso de las sondas multilocus persistió por algunos años en pruebas de paternidad. Si bien las bandas producidas por estas sondas eran muy variables de una persona a otra, tenían la desventaja de que los resultados eran difícilmente reproducibles, ya que pequeñas diferencias de una corrida electroforética (voltaje, tiempo, concentración del gel) afectaban en gran medida la reproducibilidad e interpretación de los resultados.

En vista de los problemas que traían consigo las sondas multilocus, apareció pronto una variante del método que abatían tales dificultades. El nuevo método empleaba sondas dirigidas a alelos de forma específica, debido a ello, el patrón de bandeo para un *loci* se simplificaba, una banda en individuos homocigotos y dos bandas en individuos heterocigotos. El nuevo método fue llamado huella genética de DNA unilocus o SLP's (acrónimo de single-locus probes). Aunque el nuevo método era más fácil de interpretar, tenía la desventaja no gozar de una probabilidad de empate lo suficientemente pequeña cuando era empleada una sola sonda, pero afortunadamente se reducía significativamente cuando eran empleadas otras sondas unilocus en forma conjunta (7)

El estudio de casos criminales pronto se concentró en el uso de VNTR's que empleaban sondas unilocus. Fue con los VNTR's unilocus que la primera investigación criminal basada en DNA fue realizada, culminando con el arresto de Colin Pitchfork responsable de dos casos de violación y homicidio en Leicestershire en 1986 (12). El caso de Pitchfork presentó muchas de las características y virtudes del análisis del DNA. En principio, la técnica demostraba que las dos muertes separadas por tres años habían sido cometidas por un mismo individuo en vista de que los perfiles de las huellas genéticas encontradas en las muestras de las escenas del crimen correspondían por completo, además excluían a un sospechoso, del que se supo, habían presionado para que se confesara autor de los crímenes y que no correspondía con los perfiles genéticos

encontrados en las víctimas, demostrando así el poder del DNA para exonerar personas inocentes.

El arresto de Pitchfor no fue cosa fácil, requirió de una búsqueda en masa, organizada por el Servicio de Ciencias Forense del Reino Unido, en la cual se reclutaron a todos los 500 hombres de la localidad de Leicestershire, en donde habían ocurrido los crímenes. Aunque Pitchford no tenía idea sobre qué era una prueba de DNA, pudo presentir que estaría en problemas y procuró evadir el reclutamiento, sin embargo, su evasión fue detectada, y cuando su perfil mostró ser el mismo de las escenas del crimen, terminó confesando su culpa de ambos asesinatos.

Métodos basados en PCR

Del mismo modo que la dilucidación del DNA marca un antes y un después en la Biología, la técnica de PCR marca un antes y un después en una de sus ramas, la Biología Molecular. No es de extrañar que ambos descubrimientos fueran acreedores al Premio Nobel.

Las personas involucradas de alguna forma con las técnicas de Biología Molecular, saben que el análisis de DNA requiere cantidades significativas a fin de que éste pueda ser lo suficientemente sensible para ser analizado, una forma fácil de conseguirlo es amplificar por PCR el segmentos de interés, es decir, copiar un fragmento de DNA en miles o millones de veces y luego, ya en cantidades suficientes hacer con él lo que se desea. Hasta este punto las cosas pueden parecer simples, si se necesita DNA se amplifica y listo. Sin embargo antes de 1985 las cosas no eran así, un estudio de DNA implicaba cantidades significativas de muestra o bien, la clonación de segmentos de DNA, una técnicas tardada y compleja que no todos los laboratorios podían desarrollar.

La técnica de PCR parecía un salto cuántico, no requería de grandes cantidades de muestra, era rápida y fácil de montar en casi cualquier laboratorio. La amplificación por PCR proporcionaba en consecuencia un enorme aumento en la sensibilidad para detectar marcas genéticas, y permitía que el DNA de muestras degradadas fuera analizado.

Los primeros sistemas basados en PCR sólo consideraban un pequeño número de polimorfismos de un sólo nucleótido o SNP's (acrónimo de nucleotide polymorphisms) en el gen HLA-DQA1. Aunque estos sistemas eran útiles cuando la tecnología de los VNTR's unilocus fallaba, el poder de discriminación era bajo y las mezclas eran difíciles de interpretar. Por lo tanto, hubo un período en que

las pruebas de PCR de SNP's y VNTR's unilocus fueron hechas en paralelo. Fue entonces que el descubrimiento de los repetidos cortos en tandem o STR's (acrónimo de Short Tandem Repeats), junto con el desarrollo de tecnología automatizada, condujeron a los actuales sistemas a un alcance jamás visto en materia de identificación humana (13). Posteriormente, el uso de STRs suplantó estas primeras pruebas de PCR para SNP's y VNTR's unilocus en todo el mundo una vez que sus ventajas en cuanto a poder de sensibilidad y capacidad de discriminación fue demostrado, se podían resolver incluso, mezclas que pudieran haber sido observadas. Además, el tiempo requerido para realizar un análisis fue reducido ampliamente. La reducción de los costos que resultaban de la semiautomatización, cimentó los principios para la creación de las primeras bases de datos de DNA para STR's.

Métodos actuales en la identificación humana

La mayoría de los estudio de identificación humana en casos forenses se hace actualmente empleando STR's autosomales, desarrollados comercialmente en formato múltiplex (en dónde la reacción de PCR se lleva a cabo en un sólo tubo, en el cual se amplifican múltiples *loci* (14), otros recursos de variación genética que encuentran aplicaciones más especializadas en la identificación son los SNP's autosomales, marcadores para el cromosoma Y, DNA mitocondrial (mtDNA) y en menor medida marcadores para el cromosoma X.

La popularización de la tecnología del DNA ha hecho que muchos países cuenten ya con estas técnicas, incluso, sean imprescindibles para una adecuada impartición de justicia, algunos de estos países incluso, cuenta con bases de datos para su análisis y soporte estadístico, desafortunadamente, diferencias jurídicas, debidas a circunstancias históricas, sociales y legales hacen que muchos otros carezcan de dichas bases y sus beneficios. A pesar de estas diferencias, el rápido desarrollo y aceptación universal de la nueva tecnología basada en el análisis de DNA está sobre toda prueba forense (no se extrañe que su aporte en un juzgado sea actualmente considerado como prueba "reina"), todo ello, gracias a la colaboración activa entre los grupos internacionales que se coordinan bajo varias instituciones académicas y soporte gubernamental. Las recomendaciones para sus prácticas estándar, normas de calidad y actividades de colaboración se hacen a nivel global, haciendo que esta herramienta sea todavía más segura y confiable.

Perfiles de STR´s autosomales

El primer sistema múltiplex ampliamente utilizado, fue el llamado “cuadruplex” (6 Butler J.M., 2006), consistía de cuatro STR´s y tenía una alta probabilidad de empate, aproximadamente 1 en 10.000 individuos, por ello, los primeros casos criminales que implicaban perfiles STR´s autosomales debieron ser reportados conjunto con perfiles de VNTR´s unilocus. La adición subsecuente de dos STR´s más con una alta variabilidad disminuyó la probabilidad de coincidencia de aproximadamente 1 en 50 millones. Estos sistemas múltiplex de segunda generación (SGM) también incluían un análisis de PCR sobre los genes de la amelogenina homólogos en los cromosomas X y Y, por lo que se podía saber el sexo de la persona de la cual procedía la muestra. Era evidente que los STR´s eran más sensibles que otros métodos y sin ambigüedad en la asignación de variantes alélicas, así que fueron señalados como el método más conveniente para el desarrollo de bases de datos. En el año 2000, cuatro *loci* más fueron agregados al sistema múltiplex, que fue retitulado como SGM Plus (15), reduciendo la probabilidad de coincidencia a menos de 10^{-13} , es decir, 1 en un billón.

Actualmente, existen diversos sistemas, no obstante tienen muchos *loci* en común, la mayoría de ellos comprenden marcadores requeridos por el Sistema de Índices Combinado de DNA o CODIS (acrónimo de Combined DNA Index System) de los Estados Unidos que contiene 13 STR´s más un marcador para la amelogenina que es empleado en la determinación de sexo. Hasta no hace mucho eran utilizados dos sistemas múltiplex por separados con objeto de completar los requeridos por el CODIS y mejorar su eficacia, en respuesta a ello, los nuevos sistemas múltiplex son capaces de amplificar 16 *loci* en una sola reacción en que se incluye el marcador de la amelogenina. Debido a un creciente número de marcadores, las colaboraciones internacionales han recomendado el uso de los principales *loci* para facilitar el intercambio de datos a nivel internacional, en Europa por ejemplo, se usa un sistema de siete marcadores. (7)

Las probabilidades de coincidencias obtenidas con los STR múltiplex son tan bajas que sus recíprocos exceden muchas veces más a toda la población humana. Sin embargo, los reportes de DNA como evidencia en una corte o juzgado suelen ser conservadores cuando las probabilidades de coincidencia son bajas, por lo que se utiliza comúnmente los métodos basados en probabilidad para tomar en cuenta los factores que se aplican a un caso en particular

Los sistemas múltiplex se analizan empleando equipos de secuenciación semiautomatizada. Éstos son generalmente, equipos múlticanales de electroforesis

capilar que se utilizan para detectar productos de PCR que fueron marcados con fluorescencia, los cuales se combinan con software de análisis bioinformático con objeto de reducir los posibles errores del operador. Esta automatización reduce los costos y aumenta el rendimiento en el procesamiento de las muestras. La interpretación (que define los alelos en un perfil) es más difícil de automatizar. Sin embargo, ha habido progreso para convertir la interpretación subjetiva de los investigadores en reglas (heurísticas) programables, que hoy vemos traducidas en software para análisis generados por tales equipos (conocidos como “sistemas expertos”), previstos generalmente para complementar, más que para sustituir, el ojo experto del investigador. Éstos consideran el tamaño del fragmento (medido exactamente con respecto a marcadores de estándares internos y a una escala alélica usada para identificar los alelos), representados por la altura del electroferograma, área máxima y valoración del balance de heterocigotos, incluyendo un chequeo automatizado para interpretar artefactos tales como “stutters” o “tartamudeos”, los cuales pueden presentarse durante la amplificación por PCR de los *loci* microsatélites di, tri, y tetranucleótidos, fenómeno que consisten en productos de uno a cuatro repitos menos respecto a la longitud del alelo que se espera, ello como resultado del desprendimiento de la polimerasa durante la elongación (16). La calidad del DNA de las muestras de referencia que es tomada de individuos en condiciones óptimas es predeciblemente buena y hacen de los sistemas automatizados para la tipificación e interpretación un procedimiento relativamente fácil y directo. Sin embargo, en las muestras empleadas en los estudios de casos, la automatización es más difícil puesto que la calidad y la cantidad del DNA son variables y las mezclas de DNA se encuentran a menudo complicando la interpretación. Algunas irregularidades en los perfiles también pueden tener lugar por razones biológicas (por ejemplo las mutaciones) y si se utilizan métodos que son bastante sensibles para detectar una sola molécula de DNA con un bajo número de copias, la contaminación basada en el laboratorio de uno o múltiples alelos es fuertemente posible, de modo que son necesarias otro tipo de estrategias para su interpretación.

El análisis forense del DNA basado en STR´s ha alcanzado la aceptación mundial del público y de los profesionales como un medio confiable en la identificación individual, teniendo un impacto importante en los sistemas de impartición de justicia. El aumento en la sensibilidad de los métodos del DNA ha permitido la reapertura y solución de casos sucedido hace mucho tiempo y también ha llevado a la exoneración y libertad de presos condenados por la justicia (algunos de los cuales aguardaban incluso, una ejecución con pena de

muerte). La mayoría de estos casos han sido en los Estados Unidos, muchos de los cuales han sido llevados por el “Proyecto Inocencia” (17), donde la prueba “postconvicto” atrae el financiamiento federal (7)

SNP´s autosomales

Los polimorfismos de una sólo nucleótido o SNP´s (acrónimo de Single Nucleotide Polymorphism), son variaciones de secuencia de DNA debidas al cambio de una sola base. Aunque un SNP´s es una mutación puntal, sólo es considerado como tal si está por arriba del 1% en una población, en vista de que las mutaciones puntuales constituyen hasta el 90 % de la variabilidad genética humana, tal criterio es importante ya que permite identificar variantes que han conseguido fijarse de forma significativa en una población.

El potencial de los SNP´s como fuente de variación no ha pasado por alto para los genetistas forenses quienes ven ellos una poderosa herramienta para la identificación.

Al comparar los STR´s con los SNP´s se advierte que la variabilidad de estos últimos es mucho menor, de manera que el poder de discriminación o capacidad de excluir una persona al azar por tener las mismas marcas genéticas que se analizan, también lo es. Debido a ello se exige que el número de SNP´s utilizados con motivos de identificación humana sean de al menos 70 SNP´s como un mínimo para que exista una equivalencia con los 13 *loci* STR´s que comprende el CODIS (18).

Al igual que otros tipos de sistemas de identificación, deben sopesarse los beneficios y desventajas que presenta un sistema, en este caso, una de las desventajas de los SNP´s es la de resolver mezclas, difíciles de resolver aún con otros sistemas de marcadores, pero que bien pudiera ser superadas por raros SNP´s tri alelicos.

La principal ventaja vista en los SNP´s es que éstos pueden ser detectados en fragmentos muy pequeños de DNA, algunos sistemas de análisis incluso podrían detectarlos en segmentos no mayores a 50 pares de bases, más pequeños que cualquier sistema conocido que se base en STR´s, lo cual hace de los SNP´s el tipo de marcadores de interés para el análisis del material seriamente degradado. Los desafíos técnicos enfrentados en el World Trade Center condujeron al uso de SNP´s para la tipificación forense (19, 20). La Red Europea de los Institutos de Ciencias Forenses (European Network of Forensic Science Institutes; ENFSI) y el Grupo de Trabajo Científico en Métodos de Análisis de DNA (Scientific

Working Group on DNA Analysis Methods; SWGDAM) del FBI en los Estados Unidos están determinando sistemas múltiplex potencialmente útiles de SNP's además de generar las recomendaciones necesarias para la estandarización global (21), aunque es difícil imaginarse que los perfiles de SNP puedan sustituir los sistemas basados en STR's.

Cromosoma Y

El cromosoma Y es un cromosoma sexual siempre presente en los varones, el hecho de estar solamente en varones pone de manifiesto que los procesos de herencia con los que cuenta deben ser diferentes al de los otros cromosomas, y en efecto, la herencia es sustancialmente diferente. Una de las características del cromosoma Y que lo hace diferente a otros cromosomas es que prácticamente no recombina, pues aunque se sabe que el cromosoma Y puede recombinarse con el cromosoma X, se ha visto que las regiones recombinantes son específicas y demasiado pequeñas, por lo que la mayoría del cromosoma Y pasa sin cambio alguno de una generación a otra, así que mucha de la información del cromosoma Y de un varón, seguramente será la misma que su padre, abuelo, bisabuelo etc, La importancia del cromosoma Y es precisamente esa, no cambia y puede verse en individuos varones de diferentes generaciones relacionados biológicamente por vía paterna. Se dice que las marcas del cromosoma Y que pasan en bloque y sin recombinación alguna sean llamadas haplotipos (22)

Estos haplotipos son por lo tanto menos diversos que los perfiles autosomales o genotipos que contienen un número equivalente de marcadores, conduciendo a probabilidades de coincidencia relativamente altas. Sin embargo, el cromosoma Y tienen una característica forense crucialmente útil, puede ser identificado en delitos cometidos contra mujeres, a pesar de encontrarse en una mezcla de células femeninas y masculinas, y que los métodos convencionales de perfiles autosomales no pueden resolver. La tipificación de los STR's del cromosoma Y puede dar información específica sobre el componente masculino. En una violación, los métodos de lisis diferencial permiten a menudo la obtención de un perfil autosómico para un violador, pero el violador vasectomizado o naturalmente azoospermico no deja ninguna espermatozoide; en tales casos, el perfil específico del cromosoma Y es eficaz (23), además de que puede ser detectado en un exceso de hasta 4000 veces más DNA femenino. Otra de las ventajas del cromosoma Y, es que en violaciones múltiples es posible obtener información sobre el número de atacantes al estimar el número de haplotipos.

DNA Mitocondrial

En 1967 Lynn Margulis de la Universidad de Boston describía a través de una teoría, llamada “Endosimbiótica”, que las células eucariotas eran resultado de un proceso simbiótico entre bacterias de vida libre, que podría haber ocurrido hace aproximadamente unos 2000 millones de años. La teoría endosimbiótica de Margulis, tenía como sustento el hecho de que algunos organelos presentes en las células eucariotas contaban con su propio material genético, al parecer, remanentes de una célula dentro de otra, así que el DNA de mitocondrias y plastos explicaban el fenómeno ocurrido hacia millones de años (24).

Que el DNA de las mitocondrias tuviera un origen ancestral diferente al del núcleo de las células parecía cosa curiosa, más aún el hecho de que en casi todos los animales, entre ellos los humanos, el DNA mitocondrial fuera heredado sólo por vía materna. Pronto se descubrió que el DNA mitocondrial de los espermatozoides no pasaba al interior del ovulo durante el proceso de fecundación y que existía un intrincado mecanismo celular que impedía que esto ocurriera.

Se pudo ver que la herencia del DNA mitocondrial guardaba mucho en común con el cromosoma Y, por ejemplo, que el DNA mitocondrial no recombinaba, y que los polimorfismos de un determinado genoma mitocondrial no podían ser segregados independientemente, de tal modo que eran heredados en bloque, por lo que la diversidad era reducida, la herencia era consecuentemente uniparental y a diferencia del cromosoma Y, esta se heredaba a través de la madre, por lo que todos los miembros con herencia materna comparten un mismo haplotipo, mismo que se manifiesta como una marca en la estructura genética de la población, y al igual que el cromosoma Y, puede observarse en individuos de diferentes generaciones con vínculo biológico materno, sin importar que su relación filial sea directa.

Una de las ventajas del mtDNA cuando se compara con otros marcadores genéticos es el número de copias contenidas en cada célula, las cuales pueden estar entre 1000 y 10000, lo cual depende del tipo de célula en que se encuentre, esto significa que el DNA mitocondrial tienen una mayor probabilidad de estar presente con respecto al DNA nuclear, por lo que es más sensible para su detección. Su empleo forense incluye el análisis de muestras de DNA antiguo, generalmente degradado, además de ser empleado en muestras con pequeñas cantidades de DNA, por lo que su análisis suele ser incluido en casos donde la cantidad de muestra es el condicionante a vencer. La práctica normal de su

análisis suele estar confinada a la secuencia de dos segmentos de la región control, los cuales son particularmente polimórficos, estos se conocen también como regiones hipervariables I y II (HVSI, HVSII). Gracias al DNA mitocondrial se pueden analizar pequeñas cantidades de huesos muy antiguos y muestras de fibras pilosas, que en muchos casos no cuentan con cantidad de DNA nuclear suficiente para ser analizado.

Aunque la sensibilidad para su detección es de las más altas, no lo es para su capacidad de discriminación, ya que la probabilidad de coincidencia es muy alta, aproximadamente 0.005 a 0.025. Los valores de coincidencia son evaluados generalmente por “método de conteo”, esto es, cuántas veces una secuencia específica ha sido observada en una base de datos poblacional, con una corrección por error de muestreo. Esto ha generado múltiples y duras críticas respecto a la calidad de algunas bases de datos forenses, debido a que presentan secuencias altamente improbables las cuales son detectadas por análisis filogenético.

Por otro lado, un fenómeno llamado heteroplasmia puede llevar a diferentes secuencias en una misma persona, del mismo modo, puede haber heteroplasmia en un órgano, tejido e incluso, a lo largo de un sólo pelo. Las mutaciones que caracterizan algunos tipos de heteroplasmas, suelen ser particularmente comunes en algunos sitios (conocidos como “puntos calientes”), pero esto sólo puede establecerse a través del empleo de una razón o cociente de probabilidad. La heteroplasmia puede aumentar poderosamente el poder de discriminación, tal como sucedió con la identificación de Zar Nicolas II, donde su DNA mitocondrial fue comparado el de su hermano Georgij Romanov (25, 26).

Aplicación de la genómica

Existe aún, la creencia de mucha personas, que el DNA de una muestra hallada en la escena de un crimen dará información suficiente para inferir las características físicas de un individuo, desafortunadamente aún no es así, ya que lo sólo que se identifica en el DNA son pequeñas marca a manera de perfil, el cual es único en cada uno de nosotros. La utilidad del DNA encontrado en la muestra de una escena del crimen tiene sentido cuando esta puede ser comparada con el DNA de un presunto responsable, sin embargo es muy común que no se tenga idea de quién es el dueño de dicha muestra, así que cuando el perfil de la escena del crimen no encuentra una concordancia entre los perfiles en una base de datos, cualquier información que se pueda deducir del DNA para identificar al

dueño de la muestra resulta ser de gran utilidad, y es aquí donde las aplicaciones genómicas tienen lugar. Una pieza básica de información es el sexo, tal como se ha señalado anteriormente, pero existen otras dos piezas que son sumamente importantes, el origen de la población y las características fenotípicas, las cuales también pueden ser investigadas.

Deducción de la población de origen

Aunque somos diferentes los unos a los otros, existen rasgos que nos ubican dentro de una población, la forma y color de los ojos, la piel y el cabello, así como la complejión de una persona pueden delatar su origen. De la misma forma el DNA puede dar información sobre cuál podría ser el origen de una persona. Se sabe que la mayor variabilidad genética se encuentra dentro de las poblaciones humanas, y que los individuos de diferentes poblaciones suelen ser ligeramente diferente respecto los individuos de una misma población, lo cual permite que sistemas de marcadores genéticos sean utilizados para predecir la población de origen. Con este enfoque, estudios similares pueden ser aplicados al análisis de muestras halladas en la escena de un crimen.

Algunos acercamientos se han realizado por medio de perfiles de STR's, debido a que son empleados en el área forense, pero son muy variables entre individuos. De modo que no son los mejores marcadores para predecir una población de origen. A pesar de que las aproximaciones pueden ser erróneas, hay quienes consideran que dichas aproximaciones son de utilidad, arguyendo que se reduce el número de investigaciones sobre posibles sospechosos, de modo que los tiempos requeridos para llegar al perpetrador pueden ser acortados.

Por otro lado, los haplotipos de cromosoma Y y DNA mitocondrial permiten mostrar una fuerte diferencia geográfica, por lo que contienen la información requerida para inferir la población de origen, bajo reserva de que nuevos fenómenos migratorios y constante incremento en los patrones de mestizaje contribuyen a cambios sustanciales en las diferencias interpopulacionales. Así que no debe extrañar que sus resultados sean en muchos casos engañosos.

El estudio de enfermedades a través del mapeo de genes por desequilibrio de ligamiento ha permitido que se identifiquen nuevos marcadores asociados a grandes grupos poblacionales que manifiestan susceptibilidad o tolerancias ante una determinada enfermedad. El poder que tienen estos marcadores para inferir poblaciones de origen genera grandes expectativas para el uso forense.

Actualmente se ha identificado SNP's y *loci* STR's que muestran grandes diferencias en las frecuencias alélicas entre grupos poblacionales emparentados (27, 28). Los genotipos multilocus basados en tales marcadores, también llamados marcadores informativos de ancestría o AIM's (acrónimo de Ancestry Informative Markers) parecen ser la clave para deducir una población de origen.

Información fenotípica

La idea de poder saber cómo es una persona a partir de una pequeña muestra resulta algo muy inquietante, de ser posible, cualquier persona podría ser identificada al ser reconocida por otra, sin embargo muchos de los rasgos que nos identifican tienen componentes multigénicos, por un lado está la carga genética y por el otro factores ambientales tales como la alimentación y las enfermedades, de surte que muchos rasgos fenotípicos tales como la estatura, complexión, color de la piel y rasgos faciales son difíciles de predecir.

A pesar de lo complicado que podría ser la identificación a partir de elementos fenotípicos inferidos mediante el DNA, se hacen esfuerzos que permitan dar pistas acerca de dichos rasgos. El único rasgo relevante que ha podido experimentar una seria investigación es la pigmentación. Sin embargo, aunque hay muchos genes humanos que cuando mutan son revelados de ser los causantes de una pigmentación anormal tal como el albinismo, sólo una pequeña parte parece influenciar la variabilidad "normal". Entre los genes mejor estudiados se encuentran los que codifican para el receptor de la melanocortina 1 (MC1R), la proteína HERC2, albinismo oculocutáneo tipo 2 (OCA2), transportador de solutos familia 24, miembro 4 (SLC24A4), Transportador de solutos familia 25, miembro 2 (SLC25A2), Tirosinasa (TYR) y factor regulador de interferon (IRF), los cuales en conjunto modulan los pigmentos negro/marrón y rojo/amarillo que componen la eumelanina y feomelanina respectivamente y que determinan en consecuencia el color del cabello, los ojos y la piel. La predicción en el color de los ojos a partir de este número tan pequeño de genes en el caso de colores intermedios puede ser del 75% y hasta del 90% cuando se trata de ojos de color azul y café (29).

El trabajo sobre éstos y otros fenotipos probablemente se incrementará en el futuro. Sin embargo, la complejidad de estos rasgos cuantitativos, junto con la variabilidad introducida por las diferencias ambientales y alimenticias, no habrán de significar mucho, pese a que los genes que las influyen fueran identificados. La garantía de pruebas deterministas simples, por tanto, sigue estando lejos.

Genética forense en especies diferentes a la humana

Cuando hablamos de Genética Forense pareciera que su campo de estudio sólo fuera el relacionado con los humanos, sin embargo la Genética Forense abarca un espectro muchos más amplio, el estudio de DNA no discrimina si se trata de animales, plantas, personas o DNA de cualquier otro tipo.

Por abundancia, el segundo tipo de DNA mas estudiado es el de especies animales, la mayoría son especies domésticas, generalmente perros y gatos, los cuales pueden ser testigos de un acto criminal. Es claro que un perro o cualquier otro animal no podrían testificar en un juicio, pero su DNA como evidencia sería crucial. En Investigaciones de comercio ilegal o tráfico de especies, el uso del DNA animal puede ser determinante para la consignación de responsables.

La identificación de especies animales no solo está destinada a especies de compañía, también guarda suma importancia en especies de utilidad agropecuaria, donde la compraventa de ganado suele garantizarse mediante estudios de paternidad. En algunos casos la suspicacia de ganaderos puede ser resuelta en jurados mediante estudios de DNA.

Con objeto de afrontar la demanda creciente sobre estudios de identificación de animales, se han desarrollado novedosos sistemas comerciales basados en *loci* STR's tetranucleótidos para las principales especies domésticas.

En el campo de las especies puestas en peligro, los métodos de identificación de especie específicas empleados para resolver casos forenses apuntan al gen que codifican para el citocromo b del DNA mitocondrial (30), así como para los genes que codifican las subunidades 12s y 16s de los ribosomas mitocondriales. Sin embargo el Consorcio para el Código de Barras de la Vida o CBOL (acrónimo de Consortium for the Barcode of Life) que es una iniciativa internacional dedicada al desarrollo de códigos de barra del DNA como un estándar global para la identificación de especies biológicas propone el uso de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI) que se codifica en el DNA mitocondrial como referencia en la identificación de especies específicas (31).

Las aplicaciones que tiene la identificación de especies ha permitido resolver fraudes en los que ingredientes de origen animal son sustituidos por otros de diferente especie, así como el casos de pesca engañosa donde la carne vendida correspondía a especies de menor calidad.

El uso de plantas también puede resolver casos criminales al proporcionar evidencia útil, pero suele ocurrir que la morfología no sea lo suficientemente informativa, así que el DNA podría, en principio, permitir la identificación de especies y vincular lugares específicos.

En el caso de las plantas, los genes del DNA mitocondrial no difieren tanto como para hacer la distinción entre especies estrechamente relacionadas, sin embargo, se puede emplear en estos casos el DNA del cloroplasto, algunas propuestas incluyen los genes *rbcl* y *matK* aunque parece ser que los *loci* del RNA ribosómico del núcleo podrían ser más prometedores, entre los aspirantes destaca el espaciador interno transcrito 2 del DNA ribosomal (ITS2) como una posibilidad tan viable que podría incluso ser utilizado para la identificación de animales (32).

Aunque el uso de STR´s ya ha sido utilizado para la identificación de especies vegetales, se presume que muchas plantas puedan estar mal caracterizadas, por lo que debe hacerse una revaloración de cerca del tipo de marcadores que deberán ser empleados.

En tanto, se han desarrollado métodos para facilitar la identificación de plantas que son empleadas como drogas de abuso. Un análisis especie específico basado en PCR está disponible para *cannabis sativa*, y el aislamiento de un STR hexanucleótido de la misma especie ha proveído de un marcador con cierto potencial para identificar la fuente de las muestras de *cannabis* (33).

Vista la utilidad que tiene el DNA, se ha buscado que sus técnicas sean empleadas para la identificación de microorganismos que fungen como amenaza biológica en forma directa o a través de sus toxinas, en otros casos la identificación genética de microorganismos puede dar indicios acerca de la contaminación de alimentos e incluso de la transmisión de enfermedades infecciosas en casos de negligencia médica.

El objetivo de la Microbiología Forense es desarrollar métodos de identificación que puedan demostrar que un microorganismo ha venido de una fuente particular, por lo que el análisis del DNA tiene un importante papel. Los estudios microbiológicos empleados para este rubro son aun limitados ya que son muchas las especies microbianas de las que se carece de información y que podrían ser empleadas con fines criminales. Las cartas cargadas con esporas de ántrax que fueron enviadas a través del servicio postal en los Estados Unidos durante 2001 demostraron la vulnerabilidad de la población ante estos hechos. Así como la necesidad de contar con medidas que neutralicen nuevos ataques.

Contribución de la genómica para progresos futuros

Queda claro que los avances de la Genética Forense son resultado de los progresos técnicos de otras disciplinas, la Genética y Biología Molecular contribuyen

fuertemente con su desarrollo, también lo hacen la Bioinformática e ingenierías que aplican sus conocimientos en la miniaturización de sistemas electrónicos para la detección y análisis de DNA a partir de fluidos biológicos (34), se espera que en un futuro no muy lejano estos sistemas puedan estar en uso en el mismo lugar del crimen, acortando tiempo en las investigaciones policíacas.

Por otro lado la secuenciación de genomas completos en tiempos record mediante el uso de de novedosas técnicas como la pirosecuenciación abren la posibilidad de contar con nueva información que serviría para el desarrollo de nuevos métodos de identificación. En tanto el método por sí, ya es empleado para estudio de muestras degradadas y en pequeñas cantidades al punto que se han realizado estudios de metagenómica microbiana en manchas de sangre y piel, las cuales podrían ser empleadas como huellas microbianas únicas de una persona (35, 36, 37).

Investigaciones en áreas tales como la Farmacogenética han permitido tener un conocimiento mayor a cerca de las bases genéticas y genómicas de enfermedades y diferencias en la respuesta ante el uso de determinados fármacos. Este conocimiento podía ser empleado para esclarecer si la muerte inexplicable de una persona es consecuencia de un sistema metabólico comprometido o si fue causado por el envenenamiento de un tercero, o como resultado de negligencia médica. En tanto, los científicos concentran sus esfuerzos en estudiar las diferencias metabólicas entre las personas con objeto de generar medidas preventivas y protocolos de autopsias que permitan establecer las causas de muerte (38).

Quedan muchos retos por resolver en la Genética Forense, algunos son problemas de tipo técnico, otros de tipo bioética. Sin importar cual sea el caso las vicisitudes deberán ser resueltas a través del trabajo conjunto de investigadores, jueces, policía y población civil.

Bibliografía

- DAHM R. El descubrimiento del DNA, investigación y ciencia. 2008; No. 385, 77-85.
- BUTLER J.M. Fundamentals of Forensic DNA Typing. Elsevier Academic Press, San Diego. 2010.
- BOOM R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., P.M. Wertheim-van D., and Noordaa J. V., Rapid and simple method for purification of nucleic Acids. *J Clin Microbiol.* 1990; 28:495-03.
- WALSH P.S, Metzger D,A, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques.* 1991; 10(4):506-13.
- GILL P., Jeffreys A.J., Werrett D.J. Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature.* 1985; 318, 577-79.
- BUTLER J.M. Genetics and Genomics of Core STR Loci Used in Human Identity Testing, *J Forensic Sci.* 2006; Vol. 51, No. 2.
- JOBLING M.A. and Gill P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Review Genetics.* 2004; 5, 739-51.
- WYMAN A. and White R. A highly polymorphic locus in human DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1980; 77: 6754-58.
- JEFFREYS A. J., Wilson V. & Thein, S. L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature.* 1985; 314, 67-73.
- JEFFREYS A. J., Wilson V. & Thein, S. L. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature.* 1985; 316, 76-79.
- BRETTELL T.A., Butler J.M., Saferstein, R. Forensic science. *Anal.Chem.* 2005; 77: 3839-3860.
- RANA Saad R. Discovery, development, and current applications of DNA identity testing. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 2005; 18(2): 130-33.
- KASHYAP V.K., Sitalaximi T., Chattopadhyay P., Trivedi R. DNA Profiling Technologies in Forensic Analysis, *Int J Hum Genet.* 2004; 4(1): 11-30.

- BUTLER J.M. Forensic DNA Typing “Biology, Technology, and Genetics of STR Markers”, Elsevier Academic Press. Second Edition, USA. 2005.
- COTTON E.A., Allsop R.F., Guest J.L., Frazier R.R., Koumi P., Callow I.P., Seager A. and Sparkes R.L. Validation of the AMPFISTR SGM plus system for use in forensic casework. *Forensic Sci. Int.* 2000;112, 151–61.
- DUEWER D.L., Kline M.C., Redman J.W., Butler J.M. NIST Mixed Stain Study #3: signal intensity balance in commercial short tandem repeat multiplexes, *Anal. Chem.* 2004; 76: 6928-34.
- Innocence Project [en línea]. Disponible en <http://www.innocenceproject.org> [acceso: 20 marzo 2011].
- VALLONE P.M., Decker A.E., Butler, J.M. Allele frequencies for 70 autosomal SNP loci with U.S. Caucasian, African American, and Hispanic samples. *Forensic Sci. Int.* 2005; 149: 279-86.
- BIESECKER L.G., Bailey-Wilson J.E., Ballantyne J., Baum H., Bieber F.R., Brenner C., et al. DNA identifications after the 9/11 World Trade Center attack. *Science.*2005; 310:1122-23.
- BUTLER J.M., Shen Y., McCord, B. R. The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J. Forensic Sci.* 2003; 48, 1054–64.
- DIXON L.A., Dobbins A.E., Pulker H.K., Butler J.M., Vallone P.M., Coble M.D., et al., Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs--results of a collaborative European (EDNAP) exercise.*Forensic Sci Int.* 2006; 1;164(1):33-44.
- RANGEL-VILLALOBOS H. La historia del hombre descrita por el cromosoma Y; en: *Historia Biológica del Hombre en América*. Coordinador Gonzalez-Martín A. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, México. 2006.
- SHEWALE J. G., Sikka S. C., Schneida E. & Sinha S. K. DNA profiling of azoospermic semen samples from vasectomized males by using Y-PLEX 6 amplification kit. *J. Forensic Sci.* 2003; 48, 127–29.
- SAGAN L. On the origin of mitosing cells *J Theor Biol.* 1967; 14(3):255-74.
- IVANOV P.L., Wadhams M.J., Roby R.K., Holland M.M., Weedn V.W., Parsons T.J. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nature Genet.* 1996; 12, 417–20.
- YANG D.Y., Speller C.F., Technical Tips for Obtaining Reliable DNA Identification of Historic Human Remains, *Technical Briefs In historical archaeology.* 2006. 1: 11–15.

- SHRIVER M.D., Smith M.W., Jin L., Marcini A., Akey J.M., Deka R., et al. Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 60, 957–64.
- COLLINS-SCHRAMM H.E., Phillips C.M., Operario D.J., Lee J.S., Weber J.L., Hanson R.L., et al. Ethnic-difference markers for use in mapping by admixture linkage disequilibrium. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 70, 737–50.
- LIU F., Van D.K., Vingerling J.R., Hofman A., Uitterlinden A.G, Cecile A., et al. Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes. *Current Biology.* 2009; 19(5):R192-3.
- BRANICKI W., Kupiec T. & Pawlowski R. Validation of cytochrome b sequence analysis as a method of species identification. *J. Forensic. Sci.* 2003; 48, 83–87.
- International Consortium for the Barcode of Life [en línea]. Disponible en <http://ibol.org> [acceso: 20 marzo 2011].
- YAO H., Song J., Liu C., Luo K., Han J., Li Y., et al. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals *PLoS One.* 2010; 5(10):
- HSIEH H.M., Hou R.J., Tsai L.C., Wei C.S., Liu S.W., Huang L.H., et al. Linacre A. and Lee J.C. A highly polymorphic STR locus in *Cannabis sativa*. *Forensic Sci. Int.* 2003; 131, 53–58.
- YEUNG, S.H., Liu P., Del Bueno N., Greenspoon S.A., Mathies R.A.. Integrated sample cleanup-capillary electrophoresis microchip for high-performance short tandem repeat genetic analysis. *Anal.Chem.* 2009; 81:210- 17.
- DIVNE A.M., Edlund H., and Allen M., Forensic analysis of autosomal STR markers using Pyrosequencing. *Forensic Sci Int Genet.* 2010;4(2):122-29.
- FIERER N., Lauber C.L., Zhou N., McDonald D., Costello E.K., Knight R. Forensic identification using skin bacterial communities. *Proc Natl Acad.* 2010; 107(14):6477-81.
- BRENIG B., Beck J., Schütz E., Shotgun metagenomics of biological stains using ultra-deep DNA sequencing. *Forensic Sci Int Genet.* 2010; 4(4):228-31
38. Budowle B., Van D.A. Extracting evidence from forensic DNA analyses: future molecular biology directions. *Biotech.* 2009; 46: 339–50.

Métodos computacionales en bioinformática

Abdiel Emilio Cáceres González

De acuerdo con el Instituto Europeo de Bioinformática, la bioinformática es la aplicación de la tecnología asistida por computadoras para manipular y analizar datos biológicos (1). El rápido desarrollo de la tecnología ha permitido que las computadoras sean una herramienta muy útil en el campo de la bioinformática.

En un principio, la computadora servía simplemente como máquina de escribir, pero pronto se utilizó como bodega de datos, y con ello, se plantearon nuevos retos computacionales, para permitir el almacenamiento ordenado, el análisis, incluso la deducción automática de nuevo conocimiento (2).

Actualmente la bioinformática es un área de estudio en la que se puede trabajar principalmente desde ambas perspectivas: Desde la biología, en particular desde la biología celular, aunque no se restringe a este campo de estudio; y desde la informática, asistiendo en la creación de métodos computacionales efectivos que permitan manipular la información de manera automática.

En la bioinformática convergen muchas áreas de conocimiento, biología y computación principalmente, pero también matemática aplicada, química, bioquímica, y física.

La utilidad de la computadora, específicamente los procesos que se llevan a cabo, son una gran ayuda para los científicos de ambas áreas de estudio, tanto de las ciencias computacionales como de la biología celular. Para los científicos de ciencias computacionales, la biología celular permite desarrollar nuevos procedimientos computacionales que modelen algún tipo de comportamiento propio de las células y de los seres vivos, para poder aplicarlo en problemas específicos, como problemas de optimización (3; 4) y problemas de reconocimiento de patrones (5); mientras que los científicos en biología celular utilizan software de computadora como herramientas para facilitar tareas de manipulación, almacenaje y análisis datos genéticos y moleculares (6), clasificar objetos o incluso en casos más avanzados, de llegar a conclusiones a partir de hechos y reglas bien formadas como en (7; 2).

Este capítulo tiene dos propósitos, el primero es ofrecer un panorama general de cómo la biología celular ha cambiado desde el uso de la computadora; y el segundo es presentar una colección aunque incompleta sí representativa de las estrategias algorítmicas, que son frecuentemente utilizadas en algunas tareas que son comunes en bioinformática como el secuenciamiento del DNA, el mapeo del DNA, la tarea de comparar cadenas y otras.

La biología celular asistida por computadora

Los procesos computacionales se han mejorado en gran medida a causa del avance en el conocimiento de la biología, incluso de la biología celular. Gracias a la biología celular, el campo de las redes neuronales artificiales se ha desarrollado enormemente permitiendo resolver problemas de reconocimiento de patrones; la genética a partir de los aportes de Mendel se sentó las bases para los algoritmos genéticos que se aplican frecuentemente en problemas de optimización.

La biología ha aportado mucho para el desarrollo de las ciencias computacionales, y ésta ha devuelto el favor permitiendo un acelerado ritmo en la generación del conocimiento tanto en la biología celular, así como en muchas otras áreas, se estima que la cantidad de información que se generó hasta hace un par de décadas, se podía almacenar en una cantidad de memoria que se puede expresar en el orden de los ExaBytes (8) que es una cantidad enorme de memoria, de hecho en la cuenta de Lyman y Varian (4×10^{12} bytes) se incluyen fotografías, videos, texto, secuencias genómicas, proteómicas y muchos otros tipos de información y la cantidad de información sigue aumentando año con año.

Para el almacenamiento, manipulación y extracción ordenada de la información, en la actualidad se utilizan bases de datos que almacenan la información que es presentada desde diversas fuentes: de artículos de investigación, de divulgación, de libros especializados, de fotografías, videos o en registros de sonido, aún mapas tridimensionales del cuerpo humano. Casi cualquier material puede ser digitalizado y almacenado en una computadora, duplicarlo y compartirlo a otras computadoras, todo esto con un costo que día a día va disminuyendo. El poder de almacenamiento es importante, pues el ritmo de generación de datos es mucho más acelerado que la capacidad para estudiar y asimilar los datos generados.

La necesidad de almacenar información

En sus inicios, los logros de la biología celular se realizaban de manera aislada y se almacenaban principalmente en medios convencionales como el papel, con la llegada de las computadoras y hasta finales de la década de 1980 se dió un gran avance en el almacenamiento de información, para darse una idea de esto, en esa época se conocían en GeneBank (9) casi 35 millones de pares de bases y poco menos de 40 mil secuencias genéticas, pero los avances tecnológicos han propiciado un crecimiento exponencial, de tal modo que a finales de la década de 2000, se reportaron casi 100 mil millones de pares de bases y casi 100 millones de secuencias genéticas (10).

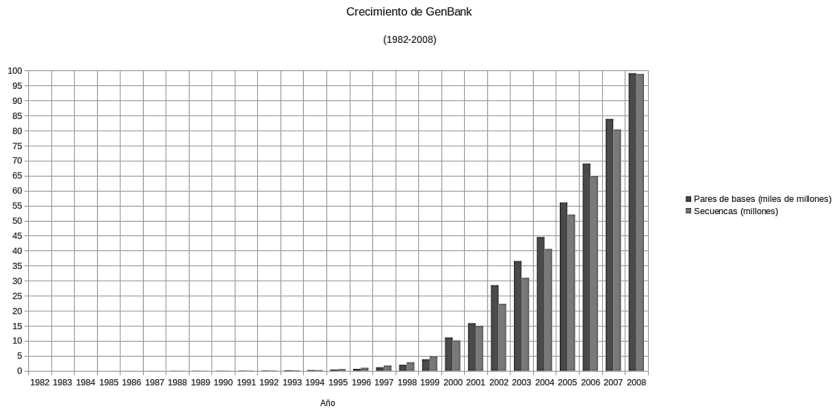


Figura 1 Crecimiento de la base de datos de GenBank desde 1982 hasta 2008

Solamente en un año, de 2009 a 2010, una de las divisiones de GeneBank (*TSA Transcriptome shotgun data*) reportó un crecimiento de un 900% (véase la figura 1), aunque en forma global el crecimiento de esta famosa base de datos fué del 12%, la cantidad de datos actualmente se estiman en el orden de los miles de millones (10).

Aunque GeneBank es una de las principales bases de datos especializadas (16) en ciencias biológicas, existen muchas otras que comparten su información en la comunidad de interesados en la materia, de acuerdo con Galperin y Fernández-Suárez (19), se han registrado 1380 bases de datos especializadas, agrupadas en 14 categorías y 41 subcategorías, aunque Siva-Kiran, Setty, &

Hanumatha-Rao (11), hablan de 1669 bases de datos reportadas en 2009; a pesar de la discrepancia de la información, es claro que son muchas bases de datos especializadas en bioinformática, esto habla de la explosión de conocimiento y la gran cantidad de información que se ha almacenado hasta la fecha, también de la gran variedad de especialidades y subespecialidades que se han creado y de la necesidad de estandarizar métodos y formatos para la manipulación electrónica de información biológica (12).

Sin embargo el almacenamiento masivo es apenas una parte de la utilidad de las computadoras. Junto con el almacenamiento hay otras dos actividades más, la recuperación de la información mediante consultas y el procesamiento de esa información que puede generar nueva información que debe almacenarse también.

La necesidad de recuperar información

Almacenar información sería inútil si no fuera posible su recuperación o la interrelación entre los elementos almacenados. Existen al menos un par de problemas computacionales relacionados a la administración de la información de una base de datos (y particularmente de una base de datos especializada en datos biológicos):

El lenguaje de consulta. Al tratar de recuperar información de un medio electrónico de almacenamiento masivo de información es necesaria una tarea de decodificación, puesto que para ser almacenada necesariamente se debe hacer codificando la información en un formato propio de la base de datos elegida. A la fecha se han realizado muchos esfuerzos para establecer estándares que permitan menos esfuerzo humano para aprender el lenguaje de consulta de cada base de datos.

Los formatos de consulta que más frecuentemente son utilizados son: GeneBank (13), donde los datos se almacenan de una forma que es legible para las personas y es fácilmente manipulable y fácilmente se pueden crear herramientas computacionales para analizar los campos que son almacenados, es utilizado por la NCBI para almacenar los registros de secuencias genéticas, de proteínas, genes, nucleótidos y otros. FastA (*Fast-All*) (14), es un formato creado en 1985 para un programa de secuenciamiento de proteínas y que desde entonces ha sido utilizado por la mayoría de los programas de secuenciamiento utilizados en bioinformática. BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (15) es un formato utilizado para crear, almacenar y manipular archivos de alineamiento local de secuencias, se puede utilizar para DNA, RNA o para proteínas.

La recuperación de la información. La recuperación de la información es quizás una necesidad que no se menciona, pues al utilizar una base de datos, es implícito que se debe poder recuperar la información guardada. La información almacenada y que se desea recuperar tiene una naturaleza compleja, en el sentido de que la mayoría de los usuarios de las bases de datos biológicas no son expertos en lenguajes de consulta convencionales como SQL (*Structured Query Language*), este hecho introduce una nueva complejidad pues los datos deben ser accesibles a un nivel de abstracción mayor (más cercano al usuario).

En la práctica común de bioinformática, el uso de interfaces especializadas que permiten la visualización de los datos recuperados es conveniente cuando las consultas son pocas, y el usuario puede leer, comprender y analizar las respuestas de la consulta; pero cuando las necesidades crecen, es decir, cuando las respuestas de las consultas son suficientemente grandes, se requiere un nuevo formato de lectura de información, esto hace necesario nuevas formas de codificación y decodificación de la información que inherentemente se alejan de la comodidad del usuario. Para estas últimas se han creado lenguajes como XML (*Extensible Markup Language*) (17,18), que tiene una facilidad agregada, es un lenguaje semiestructurado, que permite un fácil aprendizaje y una mejor interacción con usuarios aún sin experiencia en temas computacionales.

La necesidad de analizar información

Una vez que se tienen los datos almacenados y recuperados, es posible que se requiera realizar con ellos cierto procedimiento que permita tener nueva información que ayude a tomar decisiones o a formular conclusiones. Las ciencias computacionales ofrecen métodos para generar procedimientos efectivos que permiten solucionar problemas de tipo algorítmico.

Un problema de tipo algorítmico es aquel que puede ser resuelto mediante una secuencia finita de pasos bien determinados. Bien merece el esfuerzo unas breves palabras acerca de esta descripción de problemas algorítmicos.

La palabra *algoritmo*, es una palabra derivada del matemático persa Abu Abdallah Muhammad ibn Músá al-Jwárizmí, más conocido por al-Jwárizmí (25), quien realizó estudios sobre álgebra, geografía y astronomía entre otras. Actualmente, un algoritmo representa una guía para resolver un problema.

Los algoritmos son interpretados y reescritos en algún *lenguaje formal de programación de computadoras* (*lenguaje de programación* para ser breves), para producir el software que emplean los especialistas e interesados en hacer bioinformática.

Existe una gran variedad de lenguajes de programación, hay lenguajes de programación que se especializan en diferentes actividades, como aquellos que utilizan los científicos para obtener información, sin que les importe demasiado una atractiva interfaz con el usuario, en esta clase de lenguajes podemos citar entre otros C/C++ y sus derivados, Java, o Lisp y sus derivados; otros lenguajes de programación por el contrario, son especialmente utilizados para ser utilizados en una bonita interfaz de usuario, como Javascript, PHP (*PHP Hypertext-Preprocessor*), ASP (*Active Server Pages*) entre otros.

Las personas que diseñan algoritmos frecuentemente también pueden traducirlos a un lenguaje de programación, aunque en esta tarea se requiere de mucha dedicación y esfuerzo. Aunado a estos lenguajes, están los lenguajes de consulta como SQL (*Structured Query Language*), que permiten manejar y administrar bases de datos para una buena integración de los resultados.

Las actividades cotidianas en el campo de la bioinformática son fuente de muchos problemas algorítmicos, como ejemplos podemos citar los siguientes escenarios:

1. Se cuenta con la descripción de una enzima de restricción y una secuencia DNA y se desea determinar el mapeo de restricción de la enzima sobre la secuencia de DNA.
2. Se cuenta con suficientes muestras biológicas de seres vivos, de cada muestra se ha obtenido una secuencia de DNA y se desea agrupar los seres vivos en categorías, atendiendo a las similitudes entre los componentes de la secuencia DNA de cada ejemplar.
3. Se cuenta con una colección de pequeñas muestras de DNA, y se desea obtener la secuencia más corta que contenga a todas las muestras de la colección.

Es necesario aclarar que los problemas algorítmicos no necesariamente son resueltos mediante el uso de la computadora, ya que las actividades que se realizan en las ciencias biológicas, genéticas, físico moleculares y otras, empezaron a hacerse aún antes de la llegada de las computadoras, sin embargo, con la llegada de las computadoras las mismas actividades se realizan ahora con mayor velocidad y precisión, permitiendo con esto un avance más acelerado en las ciencias biológicas, genéticas, físico moleculares y otras.

Hacer algoritmos que resuelvan problemas biológicos no es tarea fácil, y con frecuencia el resultado no es único, pues para realizar una tarea pueden

existir más de una forma de hacerse, el problema computacional es ofrecer un algoritmo que minimice los costos computacionales, con el fin de obtener resultados más rápido y con mayor precisión.

Bioinformática en una computadora portátil

Como la bioinformática es parte biología y parte informática, se puede hacer bioinformática sin conocer todo acerca de las computadoras y cómo éstas trabajan, un bioinformático puede utilizar las bases de datos especializadas o las herramientas de comparación, o de búsqueda, interactuar con éstas y avanzar en el conocimiento en el campo de la biología, eso sí, el uso de la computadora es indispensable para hacer bioinformática.

Es necesario entonces, tener un equipo de cómputo que tenga las herramientas necesarias para hacer bioinformática. Hablando de computadoras una computadora portátil de las que actualmente son comunes en el mercado, es suficiente para utilizar las bases de datos especializadas (claro, siempre que se tenga acceso a ellas), también es suficiente para correr¹ muchas aplicaciones útiles en bioinformática.

Una computadora está conformada de dos tipos de elementos principales, el software y el hardware², el software se refiere a todos los programas de computadora, desde aquellos que son utilizados por cualquier usuario, como los juegos, los exploradores de páginas web, los procesadores de textos, y muchos otros más, hasta aquellos programas que son utilizados únicamente por la misma computadora, como el sistema operativo y todos los procesos que se corren allí y no son observables por el usuario, al menos no a simple vista.

Para hacer bioinformática se debe contar con el software adecuado, empezando por el sistema operativo. Aunque existen muchos sistemas operativos, de acuerdo con el sitio OperatingSystems en (20), a la fecha se han contabilizado 1191 diferentes sistemas operativos, sin embargo solamente 3 tipos de ellos son los más frecuentemente utilizados, y para los cuales se han desarrollado la gran mayoría de las aplicaciones, estos son todas las versiones del sistema operativo Windows, creado por la compañía Microsoft³; todas las versiones del sistema

1 El término *correr* en referencia a un programa de computadora, es un término común en informática y se refiere a la ejecución del programa con la finalidad de interactuar con él.

2 Aunque software y hardware son palabras inglesas, en español ya las hemos adoptado así en inglés, porque una traducción al español sale del contexto de la informática.

3 Microsoft. Microsoft Corporation: Software, Smartphones, Online, Games, Cloud Computing, IT Business Technology, Downloads [Internet]. 2012 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <http://www.microsoft.com/>

operativo Mac OS, desarrollado por Apple Inc.⁴; y todas las versiones basadas en Linux⁵, que en la comunidad Linux se les conoce como *distribuciones*, entre las distribuciones más populares y de uso general están Ubuntu⁶, Fedora⁷ y Debian⁸. A diferencia de Mac OS y de Windows, estos últimos tres ejemplos de distribuciones de linux se obtienen de manera gratuita y son mantenidos por una enorme comunidad de desarrolladores y colaboradores.

Para el uso común en bioinformática, cualquier sistema operativo es bueno, pero cuando quien utiliza la computadora para su trabajo bioinformático avanza en su conocimiento y se vuelve más exigente en sus herramientas de trabajo, entonces es aconsejable el uso de un sistema operativo basado en Unix/Linux, esto porque los sistemas operativos basados en Unix/Linux tienen una arquitectura de archivos y políticas de seguridad que hacen difícil que los virus afecten al sistema (21, 22); otra razón por la que se prefiere linux para hacer bioinformática es porque Unix/Linux se ha utilizado ampliamente en ambientes académicos, donde la comunidad universitaria puede colaborar y compartir resultados e incluso aplicaciones desarrolladas con licencia GNU (se pronuncia 'gnu' como una sola sílaba, y las siglas significan *Gnu is Not Unix*), que describe el uso de software libre (23), que en el caso de bioinformática hay actualmente muchas aplicaciones para diferentes propósitos particulares como simuladores biomoleculares, espectrometría de masas para biopolímeros, árboles filogenéticos y muchos otros.

Si usted decide instalar linux en su computadora, y su trabajo en bioinformática es el propósito especial de hacerlo, entonces considere utilizar la distribución Bio-Linux (26), que es una distribución basada en la distribución de Ubuntu pero que en la instalación, se instalan más de 500 programas de computadora sobre bioinformática. Sin embargo, una distribución genérica como Ubuntu funciona muy bien con esos programas y su instalación, en la mayoría de los casos es a partir del centro de software de ubuntu.

En lo que resta del capítulo, todas las descripciones de procedimientos, de programas de computadora o de herramientas computacionales serán basadas

4 Apple Inc. Apple - OS X Lion - The world's most advanced OS. [Internet]. 2012 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <http://www.apple.com/macosx/>

5 Linux Foundation. Linux.com : The source for Linux information [Internet]. The source for Linux information. 2012 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <https://www.linux.com/>

6 Canonical Ltd. Ubuntu [Internet]. Ubuntu. 2012 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <http://www.ubuntu.com/>

7 Fedora Project. Página principal del Proyecto Fedora [Internet]. 2012 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <http://fedoraproject.org/>

8 Debian GNU/Linux. Debian -- El sistema operativo universal [Internet]. Debian. 2012 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <http://www.debian.org/>

en una configuración basada en Linux (Ubuntu), y sugiriendo siempre software libre.

Herramientas de software necesarias

Una vez que se tiene la computadora con el sistema operativo adecuado, es necesario tener aplicaciones adecuadas también. En este capítulo consideraremos que el sistema operativo es Linux⁹. El software utilizado en bioinformática se puede dividir en dos categorías:

1. Software de aplicación genérica, pero útil en el quehacer científico.
 - Un programa para administrar bases de datos, como MySQL¹⁰ o PostgreSQL¹¹. Que permiten el almacenamiento masivo de información de casi cualquier tipo y actualmente mucho software incluye protocolos de comunicación que permiten la integración de la base de datos con esos programas de computadora.
2. Software de aplicación específica del área de bioinformática.

Dentro del software de la categoría de programas útiles en el quehacer científico podemos citar:

- Un programa para hacer análisis estadístico, Corsini en (24) despliega una excelente lista de software libre para análisis estadístico, sin embargo entre los más completos y con más desarrollo son R¹² y PSPP¹³.
- Un programa para hacer gráficas en general como GNUPlot¹⁴.

9 Más precisamente una distribución de sistema operativo basado en Linux, como Bio-Linux, Ubuntu, Fedora o Debian. Particularmente los ejemplos de este capítulo están probados en un sistema Ubuntu 10.10

10 Oracle. MySQL :: The world's most popular open source database [Internet]. 2012 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <http://www.mysql.com/>

11 PostgreSQL. PostgreSQL: Welcome [Internet]. 2012 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <http://www.postgresql.org/>

12 R-Project. The R Project for Statistical Computing [Internet]. The R-Project. 2012 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <http://www.r-project.org/>

13 Free Software Foundation, Inc. GNU PSPP [Internet]. GNU-PSPP. 2012 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <http://www.gnu.org/software/pspp/>

14 GNUplot. GNUplot homepage [Internet]. GNUPlot info. 2012 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <http://www.gnuplot.info/>

- Un programa para editar texto científico como LaTeX¹⁵, LibreOffice¹⁶.
- Un programa para visualizar y editar imágenes como GIMP¹⁷, Inkscape¹⁸.
- Un programa para capturar imágenes y video desde la pantalla de la computadora, como KSnapshot¹⁹.

Todos estos programas de computadora tienen alguna licencia que permite el libre uso y distribución de ellos y de los productos que se obtengan a partir de su uso.

Para trabajar particularmente en bioinformática se requieren herramientas de software especializadas y dado que hay muchas especialidades en el área y cada una de ellas puede requerir un software en particular, es difícil hacer un listado de tales herramientas, sin embargo, una lista de las aplicaciones especializadas que se instalan en la distribución Bio-Linux se encuentra en (27) donde se incluye una breve descripción del propósito del programa.

Las búsquedas especializadas

De las primeras actividades en bioinformática es la búsqueda de información que nos acerque a la frontera del conocimiento en el área de investigación. Sobre bioinformática hay una gran cantidad de revistas científicas, pero resulta impráctico buscar el tema en cada una de las bases de datos, NCBI (10) es un excelente recurso para buscar información sobre algún tema específico de bioinformática, pues indexa casi 40 mil revistas científicas de todo el mundo²⁰, además es el mayor repositorio de los resultados de investigaciones en bioinformática. Para utilizar las bases de datos de NCBI es necesario registrarse como usuario, el registro es gratuito y actualmente se puede acceder por medio de una cuenta OpenId²¹.

15 LaTeX-project.org. LaTeX – A document preparation system [Internet].2010 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <http://www.latex-project.org/>

16 Libreoffice. LibreOffice [Internet]. LibreOffice : The Document Foundation. [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <http://www.libreoffice.org/>

17 GNU Image Manipulation Program. GIMP - The GNU Image Manipulation Program [Internet]. GNU Image Manipulation Program. 2012 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <http://www.gimp.org/>

18 Inkscape.org. Inkscape. Dibuja Libremente. [Internet]. 2012 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <http://inkscape.org/>

19 KDE. KDE - KSnapshot - Screen Capture Program [Internet]. 2012 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <http://kde.org/applications/graphics/ksnapshot/>

20 La lista de revistas indexadas por PubMed y NCBI agrupa a 39,921 revistas en la fecha de la visita a la página (8 de marzo de 2012), un listado completo se puede acceder desde <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>

21 OpenID es una manera de entrar a diferentes sitios web utilizando el mismo nombre de usuario



Figura 2 Portal del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en Inglés). En la página de inicio, el portal tiene 4 secciones principales. (1) Una caja de texto donde se escriben palabras clave para hacer una búsqueda de documentos relacionados. (2) Un multipuerto de despegue hacia cada uno de los recursos de NCBI. (3) Algunos documentos importantes para aprender a utilizar el sistema de información de NCBI. (4) Una lista de recursos que más frecuentemente son utilizados.

Una vez ingresados en el portal de NCBI (véase la figura 2), hay diferentes caminos que experimentar, si ya se tiene un tema que buscar, se pueden ingresar las palabras clave en la caja de texto que aparece marcada con el número 1 en la figura 2. Un buen inicio es en la sección de los “Cómo hacer para” (*How to's*), en la sección marcada con el número 3 en la figura 2.

Ejemplo de interacción en el portal de información de NCBI

En esta parte del capítulo tendremos la oportunidad de interactuar con la base de información de NCBI, navegando por diferentes bases de datos para obtener así mismo diferente tipo de información.

Nuestro ejemplo de partida será la clase de reptiles, y digamos que deseamos obtener información taxonómica de esta clase (figura 3). Asegúrese de haber seleccionado la base de datos de taxonomía (*Taxonomy*).

y la misma clave. Actualmente se puede ver frecuentemente en Facebook o como en este caso, se puede acceder a NCBI por medio de una cuenta en Google o PayPal.

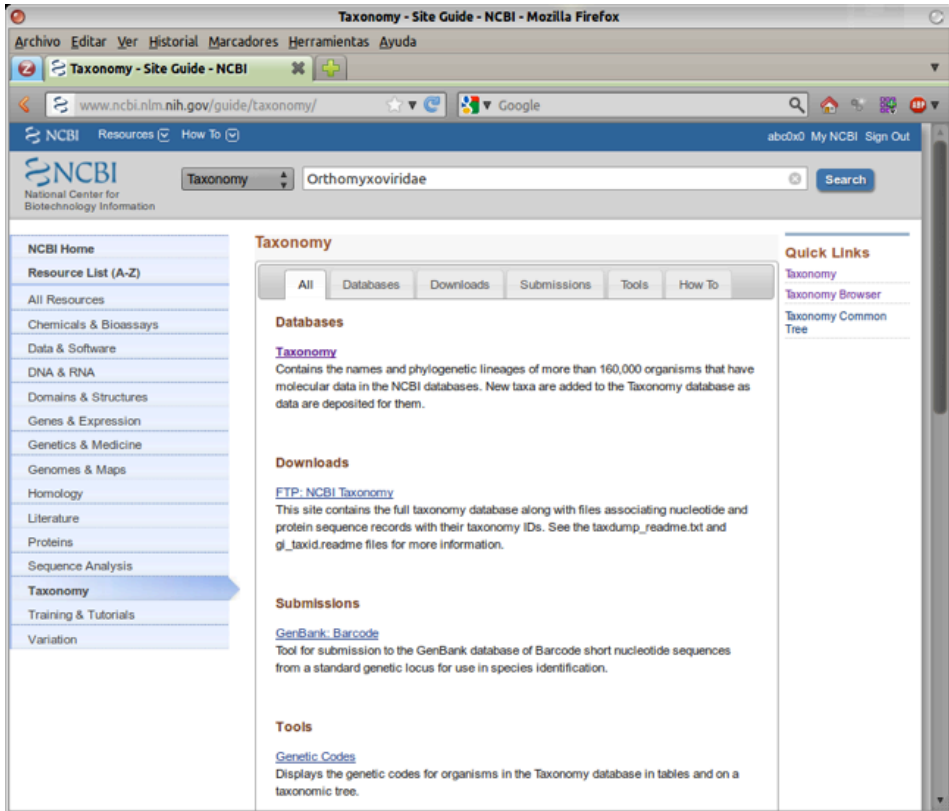


Figura 3 Base de datos de taxonomías, buscando por el término *Reptilia*.

El resultado de esta primera búsqueda es una taxa de 3 elementos: *Crocodylidae*, *Lepidosauria* y *Testudines*).

El resultado de la búsqueda se muestra como un resumen, pero es posible modificar la manera en que se muestran los resultados con estas opciones: con el nombre del taxón, una taxa, toda la información del resultado o bien el árbol común.

Las preferencias sobre la manera de desplegar los resultados se pueden modificar en la opción *Display Settings*, en la parte izquierda superior de la página de resultados de la búsqueda (véase la figura 4).

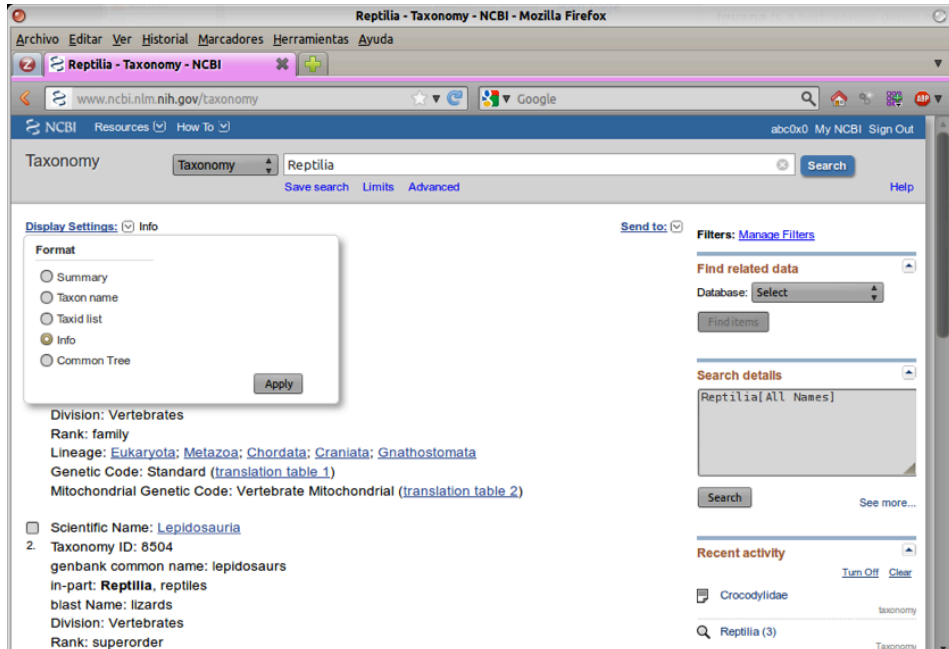


Figura 4 Modificación de las opciones de despliegue de resultados

Una vez teniendo la taxa resultante, se debe elegir algún elemento, que puede ser una taxa de menor tamaño o bien un taxón; en nuestro ejemplo, seleccionaremos *Crocodylidae*, haciendo click²² sobre la misma palabra *Crocodylidae* que tiene asociado un enlace que conecta con la información particular de la subtaxa. Como resultado de esta acción, tendremos una lista de organismos derivados, agrupados en forma jerárquica por niveles, en principio se muestran 3 niveles de información: la subfamilia, el género y la especie, pero puede extenderse tanto como se necesite.

Busquemos y seleccionemos al cocodrilo morelet (*C. moreletii*), que es una especie que se distribuye principalmente a lo largo del Golfo de México, y es muy importante en la biodiversidad de la zona. En la figura 5 se muestra la información que se encuentra en NCBI-Taxonomy sobre el cocodrilo morelet.

²² El término *hacer click* se refiere a una acción con el *mouse* de la computadora, esta acción es: posicionar el apuntador gráfico sobre la palabra subrayada y resaltada con un color diferente, luego oprimir el botón principal del mouse, que frecuentemente es el izquierdo.

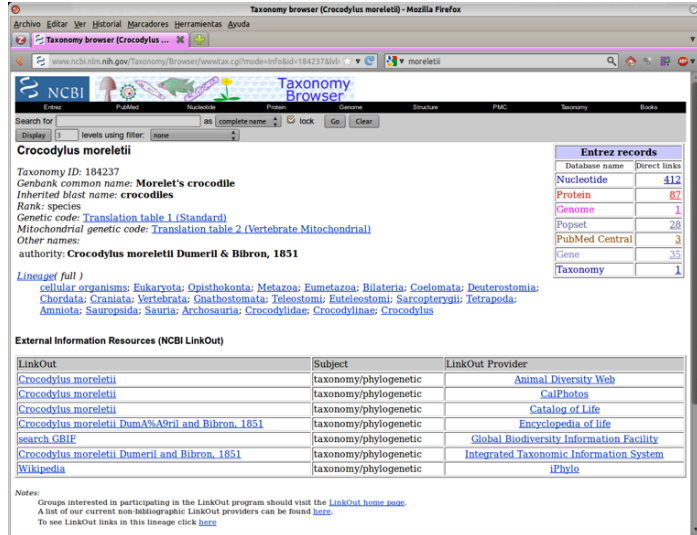


Figura 5 Información de la taxonomía del cocodrilo morelet (*C. moreletii*)

Sobre el cocodrilo morelet aún hay más información que buscar. En la parte derecha de la página de información taxonómica, se encuentra una lista con los registros en Entrez, que también es parte de NCBI y es un motor de búsqueda (como Google) pero especializado en ciencias naturales (véase la figura 6).

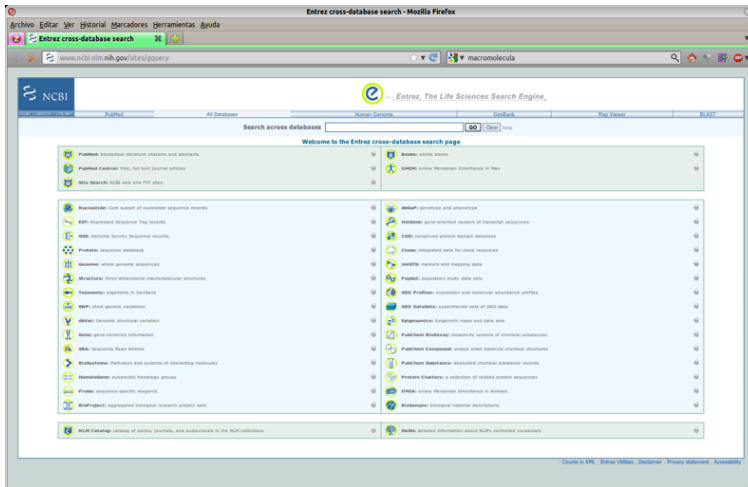


Figura 6 Entrez - Motor de búsqueda de las ciencias naturales

Siguiendo el ejemplo, los registros que aparecen sobre el cocodrilo morelet se dividen de acuerdo a la base de datos que ofrece la información. Las bases de datos son Nucleotide, Protein, Genome, Popset, PubMed Central, Gene y Taxonomy.

Seleccionemos los registros en la base de datos de nucleótidos, que a la fecha de la escritura de este texto cuenta con 412 entradas. Seleccionemos también ver los resultados con la información en formato FASTA (figura 7).

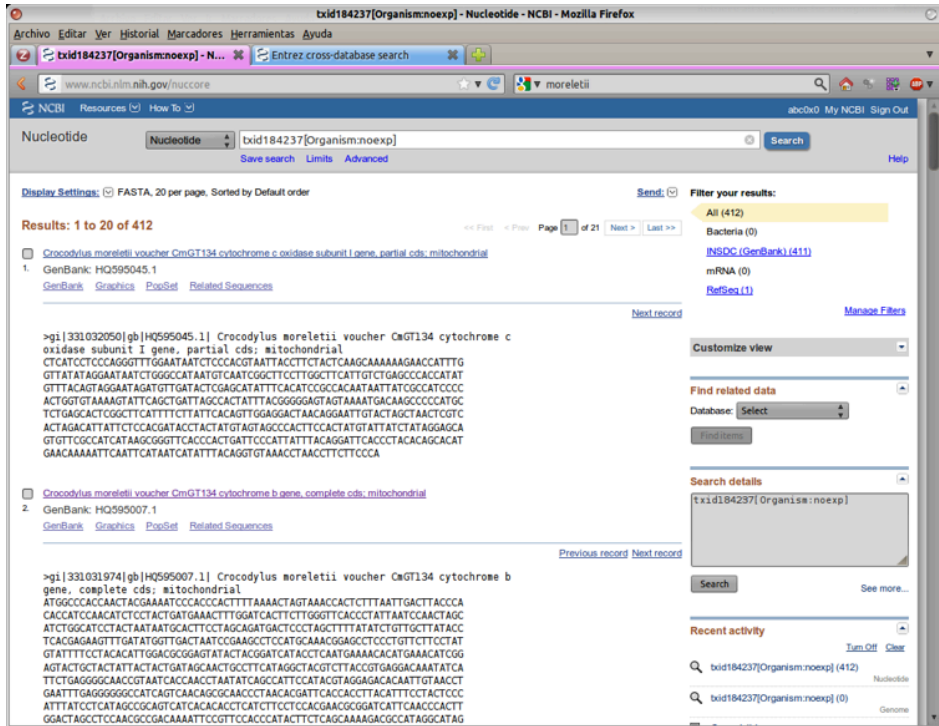


Figura 7 Información de los registros de nucleótidos del *C. moreletii* con formato FASTA.

Al seleccionar la primera entrada (Accession:HQ595045.1GI:331032050) aparece una página donde la mayor parte es texto como el que se transcribe enseguida.

< == lo siguiente debe ir en tipo de letra Mono de 10pt

LOCUS HQ595045 546 bp DNA linear VRT 30-NOV-2011

DEFINITION *Crocodylus moreletii* voucher CmGT134 cytochrome c oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial.

ACCESSION HQ595045

VERSION HQ595045.1 GI:331032050

KEYWORDS.

SOURCE mitochondrion *Crocodylus moreletii* (Morelet's crocodile)

ORGANISM *Crocodylus moreletii*

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;

Archosauria; Crocodylidae; Crocodylinae; *Crocodylus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 546)

AUTHORS Milian-Garcia,Y., Venegas-Anaya,M., Frias-Soler,R., Crawford,A.J.,

Ramos-Targarona,R., Rodriguez-Soberon,R., Alonso-Tabet,M.,

Thorbjarnarson,J., Sanjur,O.I., Espinosa-Lopez,G. and Bermingham,E.

TITLE Evolutionary history of Cuban crocodiles *Crocodylus rhombifer* and *C. acutus* inferred from multilocus markers

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 546)

AUTHORS Milian-Garcia,Y., Venegas-Anaya,M., Frias-Soler,R., Crawford,A.J.,

Ramos-Targarona,R., Rodriguez-Soberon,R., Alonso-Tabet,M.,

Thorbjarnarson,J., Sanjur,O.I., Espinosa-Lopez,G. and Bermingham,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (08-NOV-2010) Molecular Biology and Evolution

Laboratories, Smithsonian Tropical Research Institute, STRI, Unit

0948, APO, AA 34002, USA

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..546

/organism="Crocodylus moreletii"

/organelle="mitochondrion"

/mol_type="genomic DNA"

/specimen_voucher="CmGT134"

/db_xref="taxon:184237"

CDS<1..>546

/codon_start=1

/transl_table=2

/product="cytochrome c oxidase subunit I"

/protein_id="AEC50390.1"

/db_xref="GI:331032051"

```

/translation="LILPGFGMISHVITFYSSKKEPFGYMGMIWAMMSIGFLG
FIVWA
HHMFTVGMVDVTRAYFTSATMIIAIPITGVKVFVSWLATIYGGVVKWQ
APMLWALGFIFL
FTVGGLTGIVLANSSLDIILHDTYYVVAHFHYVLSMGAVFAIMSGFTH
WFPLFTGFTL
HSTWTKIQFMIMFTGVNLTFFP"
ORIGIN

```

```

1  ctcatctcc cagggtttg aataatctcc cacgtaatta ccttctactc aagcaaaaaa
61  gaaccattg gttatatag aataatctgg gccataatgt caatcggctt ccttggcttc
121 attgtctgag cccaccatat gtttacagta ggaatagatg ttgatactcg agcatatttc
181 acatccgcca caataattat cgccatcccc actggtgtaa aagtattcag ctgattagcc
241 actatttacg ggggagtagt aaaatgacaa gccccatgc tctgagcact cggttcatt
301 ttcttattca cagttggagg actaacagga attgtactag ctaactcgtc actagacatt
361 attctccacg atacctacta tgtagtagcc cacttccact atgtattatc tataggagca
421 gtgttcgcca tcataagcgg gttcaccac tgattccat tatttacagg attcaccta
481 cacagcatat gaacaaaaat tcaattcata atcatattta caggtgtaaa ctaaccttc
541 ttcca

```

<=== lo anterior debe ir en tipo de letra Mono de 10pt

La información que ofrece contiene información acerca de las personas que facilitaron la información en la base de datos, así como información de la revista donde se publicaron los resultados de los experimentos.

Utilizando la opción *Send to* La información se puede enviar a diferentes destinos como un archivo para ser utilizado con otra herramienta, enviarlo como archivo adjunto en un correo electrónico, integrarlo como parte de un documento en formato electrónico, entre otros; también puede ser copiado al portapapeles, agregado a una colección y enviarlo como entrada para una herramienta de análisis. Si se desea guardar la información en un archivo, se debe elegir entre diferentes formatos: PopSet, GenBank, FASTA, ASN.1, XML, entre otros.

Si por el contrario, se desea hacer un análisis utilizando esta entrada, como una comparación de secuencias haciendo alineamiento, se puede utilizar BLAST como destino, o bien, hacer un análisis estadístico, entonces se debe utilizar una vista de árbol (*tree view*). El resultado de esta última selección se muestra en la figura 8, donde la secuencia 331032014 en el índice Popset corresponde precisamente a la entrada HQ595045.1 de GenBank, el cocodrilo morelet.

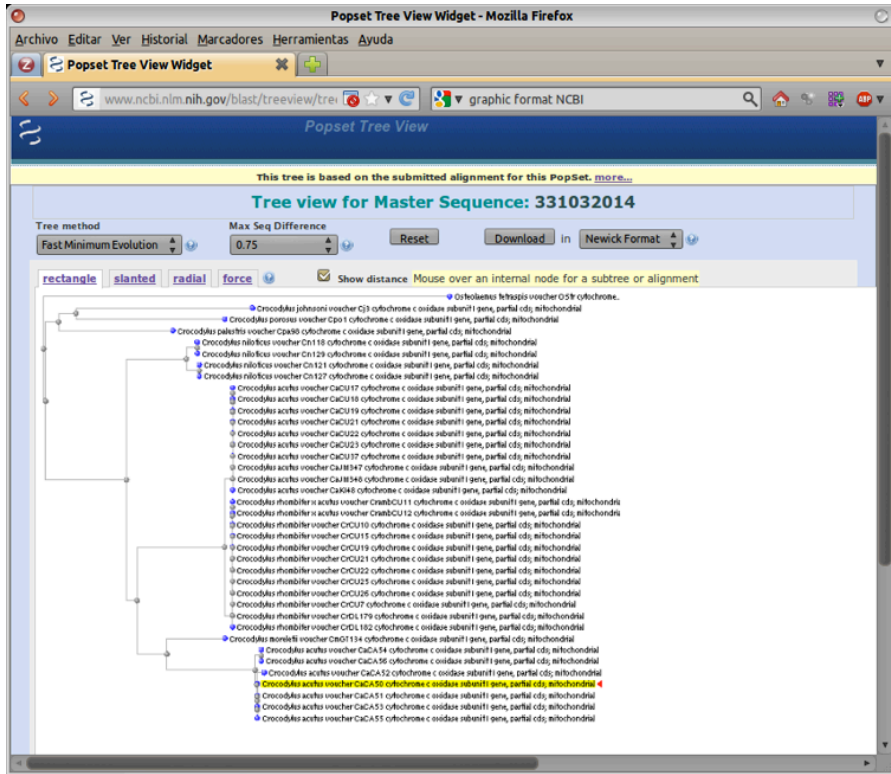


Figura 8 Vista de árbol filogenético de la secuencia 331032014

Interacción hombre-máquina

Existe una estrecha relación entre la facilidad de uso de una herramienta y la productividad, esto sigue siendo cierto en las herramientas computacionales. Si una tarea que debe hacer una persona se puede hacer mediante el uso de una computadora²³, el tiempo empleado en realizar la tarea será menor si la persona es diestra en el manejo de esa computadora.

Por su parte, el adiestramiento en el uso de la computadora puede llevar menos tiempo si la herramienta es más fácil de utilizar. Los programas de

²³ El uso de la computadora incluye el uso correcto de los dispositivos de entrada/salida como el teclado, mouse, monitor (principalmente); y también el uso correcto de los programas de software que estén instalados en ella.

computadora²⁴ tienen una característica que determina su calidad de utilizable. El término es *usability*, que aunque no tiene una traducción directa en castellano, en la literatura orientada al diseño de sistemas de software se le ha llamado *usabilidad*.

En la actualidad no hay un método formal que determine con suma precisión la medida de usabilidad que tiene un sistema. Para medir tal cualidad, se hace uso de encuestas a usuarios, pruebas *in situ*²⁵ del uso del software en donde un observador hace anotaciones acerca de las dificultades que muestran los usuarios.

En lo que se refiere a los programas para bioinformática, consideraremos uno de ellos, el programa Cn3D (30) distribuido por NCBI. Cn3D es un visualizador de estructuras macromoleculares. El nombre Cn3D puede entenderse por la fonética de su lectura en inglés “*see in 3D*” (véalo en 3 dimensiones).

Desafortunadamente, en la actualidad NCBI ha dejado de desarrollar la aplicación para Linux, sin embargo puede ser accesible por medio de wine²⁶ o de una máquina virtual²⁷.

Cn3D es una herramienta excelente para visualizar la información sobre la estructura de diferentes moléculas, lo más destacable es la posibilidad de tener una una experiencia en 3 dimensiones, debido a que el programa puede representar las moléculas en un modo estéreo, que permite una imagen para cada ojo del observador.

Además de la capacidad para una representación tridimensional, en Cn3D es posible correlacionar la información estructural con la correspondiente secuencia. Una de las características de las versiones más recientes, es la capacidad de alinear secuencias y visualizarlas en la ventana de visualización, con la capacidad de rotar la imagen en cualquier dirección.

24 Dentro de los programas de computadora están incluidos aquellos que son utilizados en bioinformática y que son instalados en la misma computadora o son utilizados de manera remota desde una computadora en otro lugar.

25 *In situ* (Lat. En posición). Aquí se refiere a usar la computadora de manera local, haciendo uso de los programas instalados en esa misma computadora. De paso, *In silico*, de acuerdo con (28), se refiere a los experimentos hechos por medio de simulaciones en la computadora. Actualmente hay experimentos hechos *In silico* para diseñar y descubrir nuevas medicinas (29).

26 Wine es una aplicación que instala y ejecuta aplicaciones de windows en Linux, BSD, Solaris y Mac OS X (www.winehq.org)

27 Es posible instalar en una máquina huésped una máquina virtual, se refiere a la ejecución simultánea de otro sistema operativo generalmente diferente al huésped. Dependiendo de las características de hardware de la computadora huésped, las aplicaciones que corren en modo virtual pueden ser más lentas de lo que normalmente serían en su sistema operativo nativo. En la actualidad es una buena opción para correr programas nativos de diferentes plataformas con el fin de tener lo mejor de cada sistema operativo.

Para los estudiosos de la bioinformática, Cn3D representa una poderosa herramienta, porque es posible relacionar los autores de algún artículo científico con sus hallazgos que estén disponibles en la base de datos.

Como ejemplo, supóngase que por cierta investigación se está estudiando el artículo (31), directamente en la caja de texto se puede introducir la lista de autores “Patrick R. Porubsky, Kathleen M. Meneely, and Emily E. Scott” para acceder a la información del artículo. Notamos que a la derecha de la página, hay una sección llamada “estructuras reportadas por este artículo” (Structures reported by this article), notamos que hay 2 estructuras reportadas, al seleccionar el enlace “view all” se accede a la lista de tales estructuras. Seleccionamos la primera de ellas, y su información aparece en una nueva página (figura 9).

The screenshot displays the NCBI MMDB Protein Structure Summary page for Human Cytochrome P450 2e1 in Complex With The Inhibitor Indazole. The page includes the following information:

- Title:** Human Cytochrome P450 2e1 in Complex With The Inhibitor Indazole
- MMDb ID:** 66956 | **PDB ID:** 3E61
- PDB Deposition Date:** 2008/8/15
- Updated in MMDb:** 05/2011
- Experimental Method:** X-Ray Diffraction
- Resolution:** 2.2 Å
- Source Organism:** Homo sapiens
- Similar Structures:** VAST
- Inferred Interactions:** IBS

The page also features a citation section, a biological unit section (monomeric), and a molecular graphics section. A table titled "Molecules and interactions" is shown below:

Label	Count	Molecule	Interactions
Protein and interactions			
		CYTOCHROME P450 2E1	
		CypX superfamily	
		p-450	
			<ul style="list-style-type: none"> 1h-indazole Protoporphyrin IX Containing Fe

Figura 9 Complejo citocromo humano P450 2e1 con inhibidor de indazol, a través del portal de estructuras de NCBI-MMDB

La información de la estructura puede descargarse seleccionando “View structure”, en el lado derecho de la página. Se debe seleccionar un nombre de archivo y una ubicación. Posteriormente, con la herramienta Cn3D se puede recuperar la información e interactuar con la imagen 3D (figura 10).

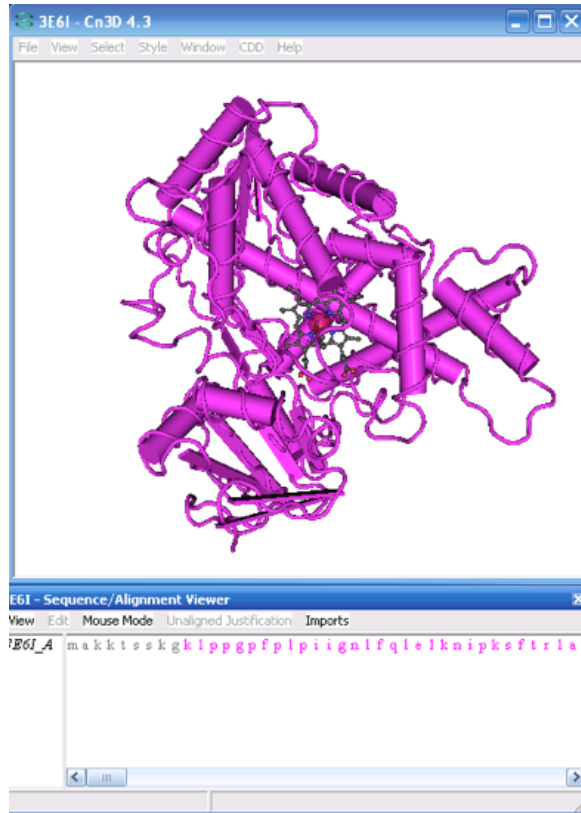


Figura 10 Complejo citocromo humano P450 2e1 con inhibidor de indazol, a través de la herramienta Cn3D 4.3

Hay una cantidad prácticamente infinita de maneras en que se puede interactuar con en Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). El uso de esta herramienta es una excelente manera de involucrarse en el campo de la bioinformática, ya que hay recursos para todos los niveles de conocimiento.

Bibliografía

- European Bioinformatics Institute E. What is Bioinformatics [Internet]. The gnomonic era. 2012 [citado 2012 mar 2]. Disponible a partir de: http://www.ebi.ac.uk/2can/bioinformatics/bioinf_what_1.html
- KOHLER S, Bauer S, Mungall C, Carletti G, Smith C, Schofield P, et al. Improving ontologies by automatic reasoning and evaluation of logical definitions. BMC Bioinformatics [Internet]. 2011;12(1):418. Disponible a partir de: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/12/418>
- BANGA J. Optimization in computational systems biology. BMC Systems Biology [Internet]. 2008;2(1):47. Disponible a partir de: <http://www.biomedcentral.com/1752-0509/2/47>
- VAN GEIT W, De Schutter E, Achard P. Automated neuron model optimization techniques: a review. Biological cybernetics [Internet]. 2008 [citado 2012 mar 2];99(4-5):241–51. Disponible a partir de: <http://www.springerlink.com/content/t34178u60n5w162g/>
- RAJAPAKSE JC, Schmidt B, Volkert G, editores. Pattern Recognition in bioinformatics [Internet]. 2007 [citado 2012 mar 1]. Disponible a partir de: <http://www.springer.com/computer/database+management+%26+information+retrieval/book/978-3-540-75285-1>
- TRUONG C, Groeneveld L, Morgenstern B, Groeneveld E. MolabIS - An integrated information system for storing and managing molecular genetics data. BMC Bioinformatics [Internet]. 2011;12(1):425. Disponible a partir de: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/12/425>
- AYYASH M, Tamimi H, Ashhab Y. Developing a Powerful In Silico Tool for the Discovery of Novel Caspase-3 Substrates: A Preliminary Screening of the Human Proteome. BMC Bioinformatics [Internet]. 2012;13(1):14. Disponible a partir de: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/13/14>

- LYMAN P, Varian HR. How Much Information, 2003 [Internet].2003. Disponible a partir de: <http://www2.sims.berkeley.edu/research/projects/how-much-info-2003/>
- BENSON DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res.* [Internet]. 2011;39 (Database issue):D32–D37. Disponible a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21071399>
10. National Center for Biotechnology Information, NCBI. Growth of GeneBank (1982-2008) [Internet]. 2009. Disponible a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/genbankstats.html>
- SIVA-KIRAN R.R., Setty M.V.N., Hanumatha-Rao G. Bioinformatics glossary based Database of Biological Databases: DBD. *J. Biochem Tech.* 2009;3(1):88–90.
- BRAZMA A. On the importance of standardization in life sciences. *Bioinformatics review.* 2001;17(2):113–4.
- National Center for Biotechnology Information, NCBI. GenBank Flat File Format: Sample GeneBank Record [Internet]. 2006. Disponible a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sitemap/samplerecord.html>
- LIPMAN D.J., Pearson W.R. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science.* 1985;227:1435–41.
- ALTSCHUL S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 1997;25(17):3389–02.
- KRÖGER P., Bry F. A computational Biology Database Digest: Data, Data Analysis, and Data Management. *Distributed and Parallel Databases.* 2003;13:7–42.
- CERAMI E. *XML for Bioinformatics.* Springer; 2005.
- ACHARD F., Vaysseix G., Barillot E. XML, bioinformatics and data integration. *Bioinformatics review.* 2001;17:115–25.
- GALPERIN M.Y., Fernández-Suárez X.M. The 2012 *Nucleic Acids Research Database Issue* and the online *Molecular Biology Database Collection*. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 2012;40(D1):D1–D8. Disponible a partir de: <http://nar.oxfordjournals.org/content/early/2011/12/04/nar.gkr1196.full>
- Operating Systems. *Operating System Reviews (History, Facts, Versions and Screenshots)* [Internet]. List of Operating Systems.2012 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <http://www.operating-system.org/index.html>

- Canonical Ltd. Ubuntu Documentation : Do I need anti-virus software? 2012 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <https://help.ubuntu.com/11.04/ubuntu-help/net-antivirus.html>
- GRANNEMAN S. Linux vs. Windows Viruses [Internet]. Linux vs. Windows Viruses. 2003 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <http://www.securityfocus.com/columnists/188>
- Free software Foundation Inc. El sistema operativo GNU [Internet]. El sistema operativo GNU. 2010 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <http://www.gnu.org/>
- CORSINI A. Free Statistics - Free Statistical Software [Internet]. Free statistical software. 2012 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <http://freestatistics.altervista.org/en/stat.php>
- Biografías y vidas. Biografía de Muhammad ibn Musa al-Jwarizmi [Internet]. Biografía de Muhammad ibn Musa al-Jwarizmi. 2012 [citado 2012 mar 8]. Disponible a partir de: <http://www.biografiasyvidas.com/biografia/j/jwarizmi.htm>
- FIELD D., Tiwari B., Booth T., Houten S., Swan D., Bertrand N. et al. Open Software for biologists: from famine to feast. *Nature Biotechnology* .2006; 24: 801 - 03.
- NERC Environmental Bioinformatics Centre. Software Packages — NERC Environmental Bioinformatics Centre. 2012.
- Worldwidewords. World Wide Words: In silico. 2012. Disponible a partir de: <http://www.worldwidewords.org/weirdwords/ww-ins1.htm>
- SRINVASA Rao V, Srinvas K. Modern drug discovery process : An in silico approach. *Journal of Bioinformatics and Sequence Analysis*. 2011 jun;2 (5):89 - 94.
- National Center for Biotechnology Information NCBI.Cn3D Home Page [Internet]. 2011 [citado 2012 mar 12]. Disponible a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>
- PORUBSKY PR, Meneely KM, Scott EE. Structures of Human Cytochrome P-450 2E1. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2008 nov 28;283(48):33698 –33707. Available a partir de: <http://www.jbc.org/content/283/48/33698.abstract>

A nivel mundial, se está impulsando la creación de centros de investigación biomédica en diferentes áreas: centros en los que se estudian modelos animales de enfermedad humana con la generación y producción de ratones knockouts, con microinyección de DNA, aplicación de células madres y aplicación de RNAi, centros de recursos en terapia génica y celular; centros de genotipificación molecular que trabajan en el análisis de variantes de secuencias (SNP's), estudios de factores de susceptibilidad genética, estudios en farmacogenómica y farmacogenética, estudios de variabilidad genotípica en enfermedades monogénicas y multifactoriales, el análisis de secuencias, estudios de ligamiento génico; análisis genómicos y proteómicos; red de centros de bioinformática para la investigación genómica y de la proteómica.

La genética funcional se ha enriquecido considerablemente gracias a la posibilidad de diseñar modelos animales de enfermedades humanas. Estos modelos, que permiten no sólo el estudio de la función de genes individuales, sino también de los mecanismos que intervienen en su regulación y de las modificaciones de su expresión en respuesta a cambios medioambientales, ofrecen grandes posibilidades para ahondar en el entendimiento de la fisiología y la patología humanas.

Tanto en el terreno de la neurología como en el de los trastornos del estado de ánimo o incluso de las afecciones de los procesos cognitivos, la aproximación biológica al conocimiento de los mecanismos neuronales subyacentes a estos trastornos, utiliza múltiples modelos animales como analogías experimentales de dichas enfermedades. Estos modelos son muy imperfectos y, por lo general, la similitud con el hombre es lejana y únicamente relativa a algunos aspectos concretos de la enfermedad. A pesar de todo, se utilizan para comprender los mecanismos de las enfermedades y establecer los nuevos tratamientos. Los enfoques disponibles abarcan diversos ámbitos de las neurociencias, desde la neurología experimental a la farmacología del comportamiento. Actualmente se utilizan cada vez más animales genéticamente modificados. Todos los ámbitos del comportamiento se someten a la experimentación animal.

En este contexto, resulta incomparablemente más fácil elaborar un modelo sobre el déficit neurológico con un componente principalmente motor debido a lesiones cerebrales que crear modelos para los trastornos del comportamiento debidos a afecciones funcionales con un importante componente límbico y, sobre todo, cognitivo. Lógicamente la creación de modelos tiene sus limitaciones, ya que se trata de reproducir en un animal sano conductas humanas muy complejas.

Se plantea entonces la legitimidad de estos enfoques experimentales, que no sólo reproducen los síntomas de las enfermedades sino que también respetan al máximo una etiología a menudo poco conocida, así como también reproducen los cambios estructurales y funcionales asociados e incluso la respuesta a los tratamientos. Estos son pues los objetivos perseguidos, con ayuda de los avances en el conocimiento sobre los pacientes, en particular en el terreno del diagnóstico por imagen funcional y, sobre todo, favoreciendo una mayor interacción entre los investigadores de las ciencias básicas y las clínicas.

Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas

Para los defensores de los animales es esencial saber cual es la necesidad de usar modelos animales cuando existen métodos alternativos como modelos matemáticos de simulaciones por computadora y modelos celulares. Sin embargo, estos procedimientos pueden ser útiles únicamente para reducir el número de animales de experimentación, pero no pueden reproducir con fidelidad el efecto de un producto químico en el sistema y órganos del cuerpo con toda la complejidad requerida. Los simuladores se pueden utilizar para examinar y determinar el potencial tóxico de una sustancia en fases iniciales de una investigación, pero el examen final debe realizarse en un sistema complejo y vivo. La más sofisticada tecnología no puede imitar las complicadas interacciones entre células, tejidos y órganos que se dan en humanos y animales (1).

Los científicos deben entender estas interacciones antes de introducir un nuevo tratamiento o sustancia en el organismo humano. La mayoría de las enfermedades son complejas e involucran interacciones dinámicas entre sistemas moleculares y celulares que influyen el desarrollo y proceso de la enfermedad. Además los estudios de la patogénesis, de las enfermedades en animales son una parte del proceso de conocimiento, generalmente deben de ser complementados, con estudios clínicos, epidemiológicos e histológicos en humanos.

Los resultados de la investigación con modelos animales proporcionan la información necesaria para diseñar pruebas humanas que también deben completarse para la aprobación legal de nuevos dispositivos fármacos y procedimientos con carácter terapéutico y de diagnóstico, es necesario conocer como un nuevo fármaco o procedimiento afectará a un sistema biológico completo antes de usarlo en humanos. Esto es crítico tanto por razones científicas, como éticas para no sobrecargar en exceso al ser humano, muchos de los experimentos

que se realizan, pueden responderse en corto tiempo en animales, ya que tienen un ciclo reproductivo mucho más corto que el humano (1).

En los códigos de ética para la investigación biomédica, los ensayos con animales tienen la obligación, de seguir el código de Nuremberg “cualquier experimento hecho en seres humanos, debe ser diseñado y basado en los resultados de la experimentación animal”.

La declaración de Helsincki adoptada en 1964 adoptada por la XIII asamblea Medica Mundial, y revisada en cinco ocasiones, cita también que la investigación medica en sujetos “debe ser basada en pruebas de laboratorio adecuadamente realizadas y en experimentación con animales”(2) .

En los últimos años y debido sobre todo al enorme avance en los conocimientos sobre los adelantos moleculares de las enfermedades ha incrementado la necesidad de disponer de modelos animales genéticamente definidos, es decir en los cuales las mutaciones genéticas que predisponen o participan en el desarrollo de la enfermedad, esta necesidad unida al gran avance de la tecnología para la manipulación genética en mamíferos, ha conducido al desarrollo de modelos animales, genéticamente modificados, estos son generalmente murinos que recapitulan muchos de los procesos que tienen lugar en la patología de las enfermedades humanas, permitiendo estudiar y reproducir los síntomas en formas controladas, proporcionando una visión mas adecuada del proceso de la enfermedad y permitiendo tener mejores modelos experimentales para desarrollar y ensayar nuevas terapias (figura 2).



Figura 2. Los animales genéticamente modificados podrían ayudar a reproducir enfermedades complejas

Existe la preocupación por las posibles consecuencias de introducir eliminar o modificar genes para obtener organismos genéticamente modificados, se

argumenta que la modificación de genes interfiere en su historia natural y que el ser humano no tiene derecho a tal ingeniería, sin embargo la mayor parte de los científicos considera que no existe diferencia esencial, en principio entre las formas tradiciones de manipulación genética practicada por siglos, como la domesticación, la única diferencia es que la manipulación por ingeniería genética es más rápida y más precisa (2).

Desde el punto de vista bioético la situación creada para la obtención de animales transgénicos portadores de genes humanos fue para la obtención de proteínas terapéuticas humanas, no es esencialmente nuevo ya que desde los primeros tiempos de la ingeniería genética molecular, se han introducido genes humanos en células humanas para obtener proteínas humanas, como la insulina, hormona del crecimiento, interferon etc. En general no se afecta ni la salud ni la integridad del animal, al quedar refringida la expresión de un gen humano en un órgano en particular, su fisiología y desarrollo no se ven alterados y por tanto se evita cualquier daño a este(3).

Modelos animales y sufrimiento

Para defender el uso de animales experimentales los científicos se basan en los esplendidos logros de la medicina preventiva, la erradicación de muchas enfermedades infecciosas y el control o disminución de la peligrosidad de otras, bajo esta premisa se asume que el valor de la vida de los animales de laboratorio no es absoluto y que es aceptable sacrificarlos por el avance del conocimiento.

Existen posturas en contra de todo tipo de experimentación en animales, pero no parece lógico que toda la carga de experimentación en sistemas vivos se lleve en el humano. La utilización de modelos animales se hace necesaria para evitar daños irreversibles en seres humanos.

Un dilema ético, lo constituye la propia investigación sobre el dolor, que requiere conductas anti éticas sin las cuales no se avanzaría en su manejo del dolor en los seres humanos. Debido a que el dolor es un estado de conciencia, y como tal, nunca puede ser observado, se hace difícil definirlo en animales, una definición del dolor reza: “una experiencia sensorial aversiva causada, por un daño que provoca una reacción motora y vegetativa para evitarlo”(3).

Conforme un organismo es más complejo los mecanismos para salvaguardar la integridad así como el desarrollo de la experiencia dolorosa y la expresión del comportamiento, relacionada con ella, lo que implica necesariamente el desarrollo del sistema nervioso. Los impulsos que generan el dolor están

localizados, en el diencéfalo, que está muy desarrollado en mamíferos y aves, no hay por tanto razones científicas para negar que los animales sientan el dolor, aunque es posible que no interpreten la sensación de la misma manera que el ser humano, ya que este reflexiona, y es sujeto de emociones.

De no tener este tipo de modelos para la investigación del dolor no se hubieran logrado avances en el conocimiento de los mecanismos, evaluación, métodos y modalidades del control del dolor, como tampoco en la anatomía, morfología, fisiología y bioquímica de los nociceptores y protecciones sinápticas, entre otros(4).

El investigador que trabaja con animales debe asegurarse que sean expuestos solo a estímulos, o prácticas necesarias para contestar la pregunta de investigación, y tomar en cuenta los principios bioéticos estipulados en las diferentes guías del dolor para el empleo de animales en investigación.

Evaluación ética

Debido a las voces que se han alzado en contra del sufrimiento innecesario de animales de experimentación, se ha discutido o en el plano internacional, el análisis de los riesgos y ventajas de la investigación científica.

Esta actitud es constructiva y contribuye a mejorar el conocimiento de la sociedad sobre las virtudes de la investigación científica y a reducir los riesgos de su aplicación, ya que con ello se han logrado grandes avances.

La legislación actual de varios países exige buenos tratos a los animales destinados a la experimentación, En Estados Unidos, la academia nacional de ciencias y los institutos nacionales de salud han emitido normas especiales para la investigación que imponen a todos los investigadores, la obligación de demostrar que sus instituciones de trabajo cuentan con las instalaciones adecuadas para el bienestar de los animales. Además su uso en la investigación está estrictamente controlado y regulado por las leyes federales, incluyendo el acta de bienestar de los animales, que regula la eliminación y la reducción del dolor, así como otros aspectos del cuidado, tales, como el hábitat, alimentación, ejercicio y bienestar psicológico. Estas normas prácticas son comunes en el ámbito internacional, sin embargo la experimentación con animales no está legislada ni regulada en muchos países de Latinoamérica(5).

Hay quienes opinan que se está exagerando en la atención a los animales para experimentación y que se desvían recursos muy necesarios para otras finalidades, sin embargo, este parece ser el mejor camino, y reconoce que al

asegurar su bienestar, se obtienen resultados más fiables y disminuye el número de experimentos que no son necesarios realizar.

En MÉXICO para garantizar el mejor tratamiento posible cada institución que utiliza animales debería establecer un comité institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), que supervise examine y vigile cada posible experimento. Estos comités deberían incluir a miembros de la comunidad científica, un bioestadista, un miembro lego, y un veterinario.

Algunos de los aspectos más importantes para cualquier proyecto que involucre la utilización de modelos animales son:

a) Instrucción y capacitación de personal profesional y técnico: el personal debe saber que los cuidados que rodean al animal influyen en forma directa sobre el resultado de los experimentos, el estado de bienestar de los animales esta íntimamente ligado a su capacidad de respuesta, de esta última inquietud, nació el uso de animales libres de patógenos específicos y de gérmenes, como condición para obtener resultados experimentales confiables y reproducibles.

b) En las condiciones de alojamiento son importantes, la cantidad de animales por caja, existe actualmente una tendencia a aumentar el espacio por animal e inclusive a estimular sus actividades por medio de ruedas u otros accesorios, las temperaturas extremas, la falta de renovación de aire, las altas concentraciones de amoníaco etc. Someten a los animales a sufrimientos innecesarios e invalidan los resultados desde el punto de vista experimental. Ellos tienen necesidades fisiológicas y de comportamiento que deben ser identificadas y proporcionadas para cada especie.

c) Buenas prácticas de sujeción, inyección, analgesia, anestesia y eutanasia, el animal de laboratorio es un ser vivo, por tanto sensible a cualquier procedimiento capaz de causar dolor y compasión en sus cuidadores.

El manejo de animales en investigación

El empleo de animales en la investigación y enseñanza involucra responsabilidad de quienes los utilizan; por tanto, es un deber evitar la crueldad y procurar su bienestar.

Es obligación de quien manipula animales con fines de estudio procurar darles un trato y cuidado apropiado y digno, desde los procedimientos de captura y durante su mantenimiento en condiciones de cautiverio previo al manejo en el laboratorio.

Asimismo, se deberá contar con la preparación adecuada y conocimientos actualizados para aplicar el principio de las 3R (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999) en el manejo de animales en el laboratorio: Reemplazar (utilización de alternativas que produzcan los mismos resultados, tales como experimentos *in vitro*, cultivos celulares, modelos inanimados, modelos por computadora), Reducir (utilizar un número mínimo de animales), Refinar (utilizar técnicas adecuadas para evitar al máximo el sufrimiento)(6).

Captura, transporte y cautiverio

Al realizar la captura de organismos animales, se procurará perturbar lo menos posible las poblaciones naturales.

Los animales deberán ser transportados al laboratorio en contenedores específicos de acuerdo a la especie. En el caso de animales de laboratorio, es conveniente hacer uso de las cajas transportadoras las cuales pueden ser de acrílico, o madera. Para el caso de ejemplares de fauna silvestre, para las aves es posible utilizar los costales de manta, colocando una base (plato) con el fin de que se maltraten lo menos posible, o jaulas cubiertas con manta para reducir el campo de visión y no se golpeen contra las paredes de la jaula.

Las condiciones de cautiverio deben limitarse al menor tiempo posible previo al experimento. En caso de que se requiera la permanencia de más tiempo en un área, se deberán contar con las jaulas, contenedores o albergues necesarios, los cuales están en función de cada especie. Estos albergues deben ser lo suficientemente amplios para permitir que el ejemplar pueda estar cómodo. El alimento debe estar disponible de acuerdo a la dieta bajo la cual se mantenía en su lugar de origen. El agua debe ser fresca y mantenerse en contenedores adecuados (botella con chupón, trasto, etc.). Los principales efectos del estrés en un animal que sufre manipulación son cambios en su temperatura y deshidratación(6).

Manejo en el laboratorio

En el diseño de una investigación o actividad de enseñanza que involucra el trabajo con cualquier especie animal, uno de los principales aspectos a considerar es su manejo con apego a normas éticas. El animal en estudio deberá satisfacer ampliamente los objetivos y requerimientos de práctica. Los animales utilizados para experimentación deberán proceder preferentemente de unidades especiales de reproducción de animales de laboratorio.

Los animales de origen desconocido no deben ser utilizados, excepción hecha de las especies silvestres que sean colectadas bajo su correspondiente autorización de la SEMARNAT o demás dependencias que lo regulen. La experimentación con especies amenazadas de extinción solo es justificable si contribuye a la preservación de las mismas.

Los animales producidos, alojados o en experimentación deberán recibir el cuidado, manejo y condiciones ambientales adecuadas (alimento y agua suficiente y espacio ventilado), así como atención médica veterinaria en todo momento.

Los procedimientos quirúrgicos, o los que ocasionen lesiones o dolor, deberán ser conducidos con la supervisión directa de personal calificado(1, 7).

En las técnicas experimentales el refinamiento es importante, por lo que se debe considerar la analgesia y anestesia, la administración de fluidos y sustancias; y en su caso, la eutanasia, utilizando procedimientos y métodos confiables, que no produzcan pánico en el animal y seguro para el personal involucrado.

La eutanasia es el acto de matar animales con métodos que induzcan una inconsciencia rápida y muerte con mínimo dolor y estrés. Debe seleccionarse el método de eutanasia más adecuado a la especie en estudio, generalmente se prefieren agentes químicos que físicos; un método que provoque la rápida pérdida de la consciencia, por definición, una muerte sin dolor(8).

El analgésico y el anestésico deberán seleccionarse para satisfacer los requerimientos clínicos y éticos, sin comprometer aspectos científicos del protocolo.

Algunos casos especiales con fines de investigación o enseñanza pueden requerir procedimientos que implican sufrimiento al animal; estos podrán aplicarse sólo si en los protocolos de experimentación se justifican plenamente y no existe forma de sustituirlos o evitarlos(9)

Procedimientos de anestesia

Los anestésicos utilizados en los animales sirven para provocarles un estado de inconsciencia con ello se evita su sufrimiento y se puede realizar su manejo adecuado. Estos fármacos varían de acuerdo a los distintos grupos taxonómicos, se han probado algunos anestésicos específicos por especie para el menor sufrimiento.

Eutanasia

La eutanasia se puede realizar con una sobredosis de anestésico inhalado en una cámara de inducción. Otra opción es la inducción de un anestésico inhalado por medio de mascarilla o cámara, seguido de una sobre dosis de barbitúrico administrado IP o IV. La eutanasia solo con barbitúricos causa dolor en algunos animales de laboratorio.

Enfoque histórico de la investigación en animales

El estudio formal con animales como una forma de comprender la conducta humana, habría comenzado con Meyer (el padre de la Psiquiatría Integrativa) en el Siglo XIX, aunque Spencer defendió este enfoque en 1855. Meyer comenzó con la primera colonia de animales para investigación en 1895 (Logan, 2005) y creía que la comprensión de los procesos básicos animales podía contribuir a la práctica clínica. Pensaba que el estudio de animales (el así llamado *enfoque comparativo*) nos ayudaría a comprender el desarrollo de los procesos mentales humanos, incluyendo el desarrollo de conductas desadaptativas y de hábitos.

Sus primeras notas de investigación, realizadas a partir de su trabajo con animales en 1897, ilustran su enfoque comparativo del desarrollo para esclarecer la relación entre el desarrollo del cerebro, los procesos mentales y el fracaso adaptativo. La comprensión de Meyer del poder potencial del enfoque comparativo no ha sido compartida por muchos de los clínicos contemporáneos.

Wolpe era un clínico de Sudáfrica que se sentía insatisfecho por la ineffectividad de las psicoterapias disponibles para tratar pacientes con fobias, leyó con interés los trabajos de investigación de Masserman (1943), quien había inducido miedo persistente en ratas y gatos. Estaba intrigado por esto y por las posibles conexiones entre los miedos de los animales y los que veía en sus pacientes. Wolpe emprendió sus propias investigaciones usando gatos, primero induciendo temores y luego buscando las formas de reducirlos y eliminarlos. La forma más efectiva que encontró para reducir los miedos en los gatos tenía dos componentes:

(1) la inducción de un estado que fuera incompatible con el miedo, alimentando a los animales y

(2) cuando estaban en ese estado incompatible con el miedo, presentando y extinguiendo, poco a poco, el estímulo de miedo.

Este procedimiento probó ser muy efectivo con los gatos, Wolpe lo generalizó a sus pacientes y desarrolló lo que hoy se llama *desensibilización sistemática* para el tratamiento de las fobias. La desensibilización sistemática es uno de los tratamientos más efectivos y comúnmente usados en la clínica psicológica. La investigación básica con animales ha permitido comprender muchos fenómenos de importancia clínica.

Una de las principales preguntas es: ¿Cómo se utilizan los animales para contribuir a la práctica clínica? Es un proceso de modelado. La más temprana y crítica contribución al uso de modelos animales para el estudio de la conducta humana es probablemente la de Pavlov, el gran fisiólogo que ganó el Premio Nobel realizando investigación sobre los jugos digestivos. Sin embargo, Pavlov es más conocido por sus investigaciones fundamentales sobre el reflejo condicionado salival, clásicamente conocido por todos los estudiantes de Psicología. Lo más importante es que él no estaba primariamente interesado en la respuesta salival per se, sino en cómo estas secreciones psíquicas permitían conocer el funcionamiento cerebral. Fue, de hecho, el primer investigador que utilizó animales, en lo que voy a llamar *proceso de modelado*, para estudiar cómo los hallazgos en animales pueden usarse para estudiar *procesos psicológicos* en humanos (incluyendo los disfuncionales) y para poner a prueba tratamientos terapéuticos para humanos, basados en pruebas con animales. Pavlov utilizó este proceso de modelado en su laboratorio junto a otros colegas, en los ahora clásicos experimentos de Shenger-Krestinikova con perros y de Krasnogorsky con niños. Pavlov estaba interesado en las funciones del cerebro en respuesta a los estímulos del medio. El y sus colegas demostraron que el comportamiento neurótico puede producirse confiablemente en animales de laboratorio, sistemáticamente estimulados (figura 3).



Figura 3. Pavlov, estudiando el paradigma de condicionamiento en perros

Modelos animales en psicología

Shenger-Krestinikova (1921) realizó con perros un experimento de condicionamiento clásico o discriminativo simple pavloviano, en el cual las presentaciones de un estímulo (por ejemplo, un círculo) eran siempre seguidas de comida mientras que un segundo estímulo (por ejemplo, una elipse) nunca era seguido de comida. La única tarea del animal era comer el alimento cuando aparecía. Estos ensayos de condicionamiento produjeron en el animal un aprendizaje de discriminación entre el círculo y la elipse, porque cuando aparecía el círculo segregaba saliva, pero no cuando aparecía la elipse. Luego, Shenger-Krestinikova introdujo cambios tales como, hacer que los dos ejes de la elipse se volvieran gradualmente más similares, es decir hacer que la discriminación fuera más dificultosa. Sin embargo, aun cuando el perro fue alimentado con la misma frecuencia, la respuesta salival condicionada resultó poco confiable, la conducta de los perros se volvió errática y agresiva y los perros se resistían incluso a ser puestos en la cámara donde recibían los refuerzos alimentarios.

Esta conducta fue tan notable que se la llamó *neurosis experimental* y no aparecía sólo en un animal, sino virtualmente en todos los animales sometidos al procedimiento de discriminaciones de dificultad creciente. Es decir que, Shenger-Krestonikova demostró que la neurosis era probablemente la consecuencia natural y válida de formas particulares de estimular al animal. Además, ella demostró que la conducta neurótica inducida podía reducirse con tratamiento psicofarmacológico con compuestos de bromo.

Krasnogorsky (1925) otro colaborador de Pavlov, demostró en niños que exactamente las mismas operaciones de condicionamiento y estimulación ambiental (condicionamiento clásico discriminativo con estímulos, con metrónomo, inicialmente con frecuencias marcadamente diferentes que eran luego transformadas en crecientemente similares) produjeron las mismas consecuencias neuróticas. Adicionalmente, se demostró que la neurosis experimental en los niños, también se aliviaba con el mismo tratamiento con drogas. Es decir, el sistema del perro modelaba el sistema humano. “Aquí hay dos mensajes importantes: El primero es la ilustración de la naturaleza del proceso de modelado, que busca paralelismos de cadenas causales entre los sistemas. El segundo es la demostración de que las conductas neuróticas no son el resultado de estados enfermos anormales sino la consecuencia natural de estímulos ambientales anormales específicos. La idea de que la conducta anormal puede entenderse como el producto de procesos naturales conocibles

es fundamental para el avance de la ciencia psicológica”(10). Estos dos mensajes fueron bien escuchados y llevaron a muchos investigadores a continuar en la línea de Pavlov para tratar de comprender otras conductas disfuncionales psiconeuróticas (Liddell, Masserman, Corson, Mowrer, Harlow, Gray, Solomon y muchos otros) incluyendo por supuesto a Wolpe cuya investigación con animales llevó a descubrir la terapia de desensibilización sistemática para las fobias. Estas son algunas de las contribuciones en Psicología para la comprensión del funcionamiento humano, a partir de la ciencia básica y la investigación con modelos animales han sido de hecho, numerosas, que han tenido impacto sobre la comprensión de los procesos humanos motivacionales, emocionales y cognitivos y sobre los tratamientos de disfunción humana. Existen otras investigaciones, seguramente hay muchas de ellas que ustedes conocen, tales como los estudios de Skinner del condicionamiento con refuerzo en palomas y sus aplicaciones en modificación de la conducta a través de la enseñanza y la dirección conductual en retardados mentales y autodestructivos, como así también del aprendizaje programado para todos nosotros. Está la investigación de Harlow y Suomi (1970) con monos, sobre el contacto confortable como una base para el amor y el apego social de la madre y el infante. Harlow comenzó este trabajo cuando la forma dominante de criar a los niños en Estados Unidos seguía las sugerencias de Watson de no mimar al niño y de separarlo de la madre. Harlow y Suomi mostraron las increíbles debilidades que aparecen en el niño, debido a una separación prolongada de la madre y/o padres.

Las investigaciones de Solomon (1980) sobre la dinámica emocional y el modelo del proceso oponente basadas en trabajos con perros, que aportaron hipótesis para los fenómenos sociales de estrés por separación humana y aflicción por la muerte de un/a esposo/a amado/a. El modelo de Solomon también aportó fundamento para las explicaciones de Siegel acerca de la dependencia humana a la heroína, de la tolerancia a la heroína y sobre las muertes por sobredosis de droga, no previstas (11)

Éstas y otras investigaciones básicas no mencionadas, han llevado a muchas intervenciones efectivas, incluyendo varias formas de modificación de la conducta, terapias conductistas, *biofeedback*, terapias de contacto. De la misma manera que la fisiología básica es la base de las prácticas médicas, la ciencia básica del comportamiento proporciona un fundamento para las prácticas psicológicas.

La naturaleza de la memoria siempre ha fascinado a los psicólogos desde las investigaciones de Ebbinghaus en el Siglo XIX. En particular la memoria de trabajo ha despertado mucho interés. La *memoria de trabajo* es el almacenamiento

de la memoria a corto plazo que se utiliza para mantener información por unos pocos segundos hasta que pueda ser utilizada y luego la información desaparece. Por ejemplo, cuando buscan un número de teléfono y luego lo recuerdan solamente hasta que lo marcan. En los animales se lo prueba a menudo mostrando brevemente una clave a la cual se sabe que responde, almacenando la información por unos pocos segundos y luego permitiendo que el animal seleccione su respuesta. Una razón por la cual la memoria de trabajo es hoy de creciente interés es que el envejecimiento y una variedad de desórdenes neurológicos son señalados como resultado de un empobrecimiento creciente de la memoria de trabajo. Algunos experimentos con animales son aquí importantes. Uno de ellos es el experimento de Tinklepaugh (1928) en el que les mostró determinadas recompensas a los monos y luego durante la postergación las sustituyó por otras menos atractivas. Al encontrar estas recompensas diferentes los monos estaban muy alterados. Esto implica expectativas de recompensa durante la demora(12). Trapold y Overmier (Overmier, Bull & Trapold, 1971; Trapold, 1970) probaron si tales expectativas persistían durante la demora y si las expectativas tenían funciones claves para la respuesta que podían guiar al animal a las elecciones correctas. Para hacer esto, introdujeron un nuevo procedimiento y lo llamaron *procedimiento de resultados diferenciales*. Típicamente, en las tareas de elección condicional discriminativa, las recompensas para las diferentes formas de elecciones correctas son las mismas (por ejemplo, una recompensa con comida común o decir *Bien*). Pero para concretar el procedimiento de los resultados diferenciales, Trapold y Overmier (1972) desarrollaron un paradigma de tarea de elección discriminativa, en el cual las recompensas para cada clase de respuesta correcta fueran únicas para esa clase de elección correcta (por ejemplo, comida para una elección y agua para otra elección, o decir *Bien* para una y *Excelente* para otra). Presenta dos formas de enseñar la discriminación(12).

Cuando compararon los resultados del método de los resultados comunes con los del método de los resultados diferenciales, encontraron efectos marcados que llamaron *efecto de resultados diferenciales*. El procedimiento del resultado diferencial dio paso a un aprendizaje más rápido, aprendizaje a una asíntota más alta, una memoria más persistente durante la demora entre las claves y las elecciones y resistencia a la interrupción durante la demora. Resultó que este efecto del entrenamiento en resultados diferenciales en aprendizaje, memoria y rendimiento es un hallazgo muy general en un rango de especies (incluyendo seres humanos de todas las edades). Estos resultados tienen implicaciones importantes para la teoría del aprendizaje (por ejemplo, Linwick & Overmier,

2006) que fue de hecho el estímulo para la investigación. Pero los resultados tienen un importante potencial para ayudar en el aprendizaje de discapacitados y personas con daños en la memoria. Puede ayudar a niños pequeños a aprender cosas que de otra manera no podrían aprender, a los estudiantes a aprender conceptos cuantitativos complejos, a personas discapacitadas a aprender relaciones que de lo contrario no podrían recordar y a personas mayores con daños en la memoria (personas con la Enfermedad de Korsakoff y con Demencia Alcohólica) que recuerdan mejor en tareas de memoria de corto término. Las técnicas de resultados diferenciales se aplican fácilmente. Después de todo, aprender a reconocer una cara vista recientemente o a nombrar a alguien después de ver su cara es una tarea de elección discriminativa condicional muy parecida a aquella desarrollada con animales. Cuando se aplica el entrenamiento de resultados diferenciales en tareas de reconocimiento facial postergado en pacientes con Korsakoff o en adultos mayores y controles apareados por dieta, el procedimiento mejora marcadamente el rendimiento de los pacientes con Korsakoff hasta niveles casi normales.

Con este ejemplo de investigación, incluyendo aquel con pacientes con Korsakoff puede servir para ayudar a quienes tienen problemas de aprendizaje y de memoria. La investigación contemporánea en ciencia básica con animales sobre mecanismos fundamentales continúa produciendo resultados que son importantes y probablemente útiles para los profesionales, estos deben prestar atención a las investigaciones básicas y estar alerta para aplicar la investigación donde es apropiada. Esto requiere también que los investigadores de laboratorio sean entrenados en cómo hacer que sus resultados sean más accesibles a los no especialistas y al público general.

Paradigmas y modelos conductuales

Los modelos animales, en el laboratorio son sometidos a diferentes pruebas y modelos para tratar de medir una conducta y obtener una respuesta lo mas parecida a la enfermedad que se quiera estudiar. Millones de ratas de laboratorio mueren todos los días en el mundo para bien de la comunidad científica. El estudio con estos animales ha hecho posible el progreso científico, permitiéndonos curar enfermedades que parecían incurables o probar medicamentos nuevos. A continuación explicaremos algunas de las pruebas a las que el cruel (según algunos) ser humano somete a estos animales para estudiar su comportamiento. Ejemplificaremos con algunos de los paradigmas conductuales a los que

sometemos a las ratas, en este caso en el ámbito de la biopsicología. Algunos ejemplos son:

- **Paradigma del campo abierto.** Se trata de colocar al sujeto en una cámara grande y vacía para registrar su actividad. Se dibujan rayas en el suelo de la cámara para estudiar la actividad contando el número de veces que la rata cruza las líneas durante la prueba. La falta de actividad y el exceso de excrementos al finalizar la prueba determinan que la rata es fuertemente tigmotóxica, esto es, que no se suelen alejar de la pared de la cámara de la prueba y que apenas se dedican a la crianza y el aseo. Es frecuente que las ratas se asusten mucho la primera vez que se las coloca en un campo abierto, pero se demuestra que tras repetidas exposiciones a este acaban acostumbrándose (figura 4).



Figura 4. Paradigma del campo abierto se mide la actividad contando el número de veces que la rata cruza las líneas durante la prueba.

- **Paradigma del intruso en la colonia.** Las pautas del comportamiento y defensivo se estudian mediante este experimento, consistente en enfrentar la rata macho dominante de una colonia (macho alfa) y una rata intrusa de menor tamaño. Podemos determinar ciertos comportamientos para cada forma de afrontar la situación. De este modo, el erizado del pelaje, los movimientos laterales de acercamiento y los mordiscos en el lomo y los costados son actitudes de ataque (macho alfa). Del mismo modo, el bloqueo, el recular, el empujar o el girar sobre la espalda (rata intrusa) indican defensa (figura 5).



Figura 5. Paradigma del intruso en la colonia, el erizado del pelaje, los movimientos laterales de acercamiento y los mordiscos en el lomo y los costados son actitudes de ataque (macho alfa).

• **Paradigma del laberinto elevado en forma de cruz.** Otro ejemplo de prueba, en este caso para observar los efectos antiansiedad de un fármaco sobre la rata. Se trata de un suelo en forma de cruz, elevado unos 50 cm sobre el suelo real. Dos de los brazos tiene paredes que evitan que la rata, llegado a un punto, se caiga. Los otros dos brazos no tienen paredes. De este modo, en función del tiempo que la rata pasa en cada tipo de brazo, se estudia la medida de la defensa o de la ansiedad (figura 6).

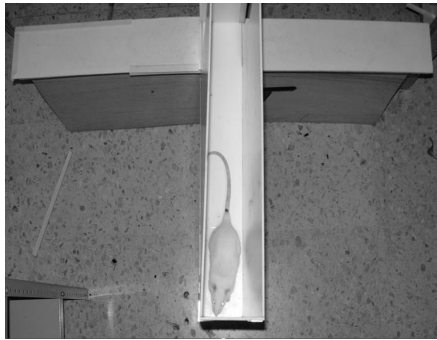


Figura 6. Paradigma del laberinto elevado en forma de cruz. Dos de los brazos tiene paredes que evitan que la rata, llegado a un punto, se caiga. Los otros dos brazos no tienen paredes.

• **Paradigma del comportamiento pavloviano.** El experimentador empareja un estímulo neutro o condicionado (por ejemplo, un sonido) con un estímulo incondicionado (por ejemplo, comida). Este último provoca una respuesta incondicionada o refleja (en este caso, salivación). Al final es el propio impulso condicionado el que determina la respuesta (es decir, que la rata, al oír el sonido, lo asocia directamente con la carne, aunque no la vea, y ya comienza a salivar) (figura 7).

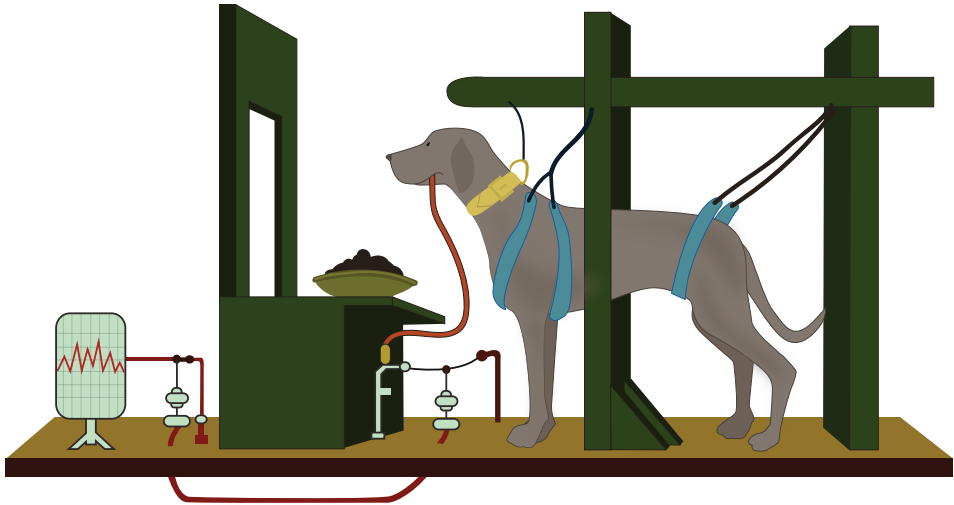


Figura 7. Paradigma del comportamiento pavloviano. Un estímulo neutro o condicionado (por ejemplo, un sonido) con un estímulo incondicionado (por ejemplo, comida).

- **Paradigma del condicionamiento operante.** A través del castigo (por ejemplo, descarga eléctrica) o el premio (comida) se induce el comportamiento del animal (por ejemplo, accionar una palanca).

- **Paradigma de la autoestimulación.** Es del tipo del anterior. En este caso se trata de que el animal pulse constantemente la palanca para que se le den impulsos eléctricos que activen sus centros cerebrales de placer (Figura 8).

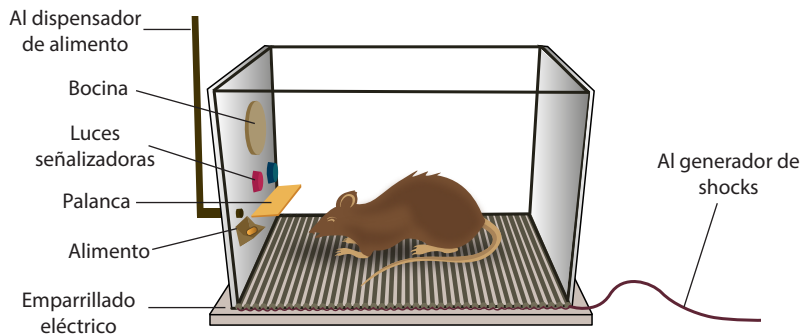


Figura 8. Paradigma de la autoestimulación. El animal pulsa constantemente la palanca para que se le den impulsos eléctricos que activen sus centros cerebrales de placer.

- **Paradigma de la autoadministración de drogas.** Igual que el anterior, solo que en este caso el animal pulsa para que se le administre una dosis y calmar así su adicción a ciertas sustancias.

- **Paradigma de la aversión condicionada al sabor.** Las ratas, al igual que muchos otros animales, Son neofóbicas, es decir, que temen aquello que les resulta nuevo. De este modo, en la alimentación, probaran una pequeña cantidad de una nueva comida antes de atiborrarse. Así ven como las sienta la comida y, en función de los resultados, siguen comiendo o no. El experimento se basa en exponerles comida sana pero con un castigo asociado (la descarga eléctrica). De este modo, al comer esa comida, tras varias descargas eléctricas, dejaran de comerla siempre que la vean.

- **Paradigma del laberinto de brazo radial.** Se utiliza para estudiar las habilidades espaciales, muy desarrolladas, de los roedores. Las ratas, para sobrevivir, lo tienen mucho más difícil que nosotros, puesto que tienen que encontrar lugares en los que se reponga rápidamente el alimento y tener en cuenta su posible saqueo por otro animal antes de su llegada. Este experimento consta de ocho pasillos situados de forma radial respecto a un centro. Al final de cada pasillo hay (o no hay, en función del experimento) un cebo de comida. Por ejemplo, un tipo de experimento es el siguiente. Cada día se sitúa a una rata en un laberinto de ocho brazos distinto, pero se le pone la comida en el mismo lugar. De este modo se acostumbra y, nada mas caer en el centro del nuevo laberinto, se dirigirá seguramente al lugar en el que hay comida. Apenas volverá a ese lugar después (sabe que ya no hay comida) y seguramente ni pasará por los pasillos en los que no hay comida. Las medidas de seguridad impiden que huela el sitio por el que ya ha pasado, dotando de veracidad a este experimento (figura 9).

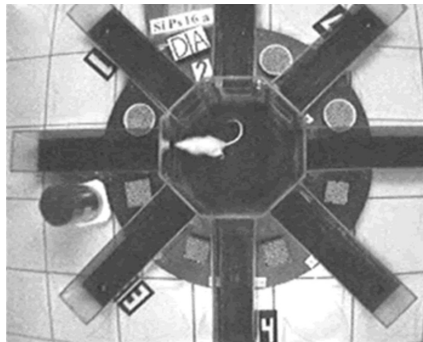


Figura 9. Paradigma del laberinto de brazo radial. Este experimento consta de ocho pasillos situados de forma radial respecto a un centro. Al final de cada pasillo hay (o no hay, en función del experimento) un cebo de comida

- **Paradigma del laberinto de agua.** Se sitúa a la rata en una piscina de agua lechosa. Una plataforma, situada poco debajo del agua y en la que puede hacer pie, es el objetivo de la rata. Pero el agua teñida la impide ver dónde está. Una vez la rata da con ella, el siguiente punto de partida en el agua es indiferente: la rata nadará directamente a la plataforma sin verla. Esto demuestra que la rata toma otros elementos físicos de la habitación como puntos de referencia.

- **Paradigma del enterramiento defensivo condicionado.** Se sitúa en una jaula material para construir nidos. En una esquina de la jaula, pegado al suelo, se sitúa un aparato que provoca descargas eléctricas ante un contacto táctil. La rata que se introduzca en la jaula, tarde o temprano, contactara con el aparato. Lo curioso del experimento es ver cómo, prácticamente todas las ratas, reaccionan (a la primera descarga) enterrando el emisor de descargas eléctricas bajo capas y capas de material para fabricar nidos, que lanzan sobre el objeto con la cabeza y las patas delanteras.

Como vemos estas son algunas de los paradigmas más usados en animales de laboratorio, no son pocas las crueldades a las que sometemos a estos animales a diario. Pero es un mal que produce un bien mucho mayor. Gracias a la experimentación con ratas podemos estudiar curas para enfermedades como el Parkinson, la Dislexia o el Alzheimer. Por tanto, como vemos, las ratas son un animal esencial en el estudio de laboratorio debido a sus similitudes con el hombre, experimentar con estos resulta barato en comparación con otras especies, y a otros muchos factores, que hacen de estos animales uno de los más útiles para el ser humano a lo largo de la historia de la ciencia.

Modelos animales en psiquiatría

Tanto en el terreno de la psicobiología, como en el de los trastornos del estado de ánimo o incluso de las afecciones de los procesos cognitivos, la aproximación biológica al conocimiento de los mecanismos neuronales subyacentes a todos estos trastornos utiliza múltiples modelos animales como analogías experimentales de dichas enfermedades. Estos modelos son muy imperfectos y, por lo general, la similitud con el hombre es lejana y únicamente relativa a algunos aspectos concretos de la enfermedad. A pesar de todo, se utilizan para comprender los mecanismos de las enfermedades y establecer los nuevos tratamientos. Los enfoques disponibles abarcan diversos ámbitos de las neurociencias, desde la neurología experimental a la farmacología del comportamiento. Actualmente se

utilizan cada vez más animales genéticamente modificados.

Todos los ámbitos del comportamiento se someten a la experimentación animal. En este contexto, resulta incomparablemente más fácil elaborar un modelo sobre el déficit neurológico con un componente principalmente motor debido a lesiones cerebrales que crear modelos para los trastornos del comportamiento debidos a afecciones funcionales con un importante componente límbico y, sobre todo, cognitivo. Lógicamente la creación de modelos tiene sus limitaciones, ya que se trata de reproducir en un animal sano conductas humanas muy complejas.

Se plantea entonces la legitimidad de estos enfoques experimentales, que no sólo reproducen los síntomas de las enfermedades sino que también respetan al máximo una etiología a menudo poco conocida, así como también reproducen los cambios estructurales y funcionales asociados e incluso la respuesta a los tratamientos. Estos son pues los objetivos perseguidos, con ayuda de los avances en el conocimiento sobre los pacientes, en particular en el terreno del diagnóstico por imagen funcional y, sobre todo, favoreciendo una mayor interacción entre los investigadores de las ciencias básicas y clínicas(13).

Lesiones cerebrales

El tema de las lesiones cerebrales resulta interesante ya que, constituye el paso inicial en el estudio de las enfermedades neuropsicológicas. Resulta imprescindible conocer las distintas patologías que afectan al encéfalo para poder comprender las deficiencias conductuales que dichas patologías producen.

Han sido muchos los estudios realizados para poder llegar a la conclusión de que las lesiones cerebrales eran la causa directa de la aparición de trastornos neuropsicológicos. Las primeras aproximaciones se realizaron gracias a la observación anatomopatológica *post mortem* de los encéfalos de los pacientes que habían padecido algún trastorno observable durante su vida, siendo el análisis *post mortem* la única posibilidad de estudiar las lesiones cerebrales hasta hace pocos años.

Pero a partir de 1972, la aparición de la Tomografía Computarizada y las técnicas de neuroimagen que han ido desarrollándose, han supuesto un avance muy relevante, ya que permiten la observación del cerebro en vivo, estas técnicas resultan imprescindibles para la investigación y para la práctica clínica en este campo. Es importante finalmente señalar, que el estudio de las lesiones cerebrales comenzó con los pacientes que han sufrido algún tipo de lesión y que de forma natural han pasado a ser los sujetos experimentales de los investigadores.

El estudio de estos pacientes ha permitido el avance del conocimiento de las funciones cognitivas, siendo éstos también a la vez los posibles beneficiarios de los descubrimientos, ya que a partir del conocimiento del deterioro que una determinada lesión ha podido provocar puede llegarse a un diagnóstico y, a partir de éste, establecer un posible tratamiento para subsanar los déficits que el sujeto presenta(14).

A pesar de lo importante que resulta el estudio de casos clínicos para el estudio de las funciones cerebrales, éste presenta grandes dificultades ya que, entre otras limitaciones, los investigadores se encuentran con que es raro que las lesiones cerebrales que se producen en diferentes sujetos sean de las mismas características, además, no siempre es posible medir una variable determinada antes y después de la lesión y no siempre se posee la infraestructura adecuada. Por todas estas razones, los estudios de modelos animales, suponen una aportación muy relevante para el estudio de las funciones superiores.

Lo que en ningún momento hay que perder de vista es la doble finalidad que tiene el estudio de las lesiones cerebrales humanas ya que no sólo se pretende conocer cuál es el funcionamiento del cerebro sino que también se trata de adquirir este conocimiento para poder establecer las estrategias terapéuticas más adecuadas para la mejora de los pacientes que padecen estos trastornos.

Modelos animales y la psiquiatría

El estudio de las patologías psiquiátricas es complicado, no es posible estudiar el comportamiento de estas usando humanos como objeto de experimentación. Por ello los métodos animales son herramientas metodológicas de gran importancia en investigación.

Los modelos animales empleados en esquizofrenia generalmente son roedores, estos son sometidos a eventos estresantes, químicos o quirúrgicos, con el propósito de generar respuestas bioquímicas y conductuales semejantes a las representadas por los individuos enfermos(15).

De acuerdo a Porsolt y Lenégre, los modelos animales de los trastornos psiquiátricos deben ser útiles para tres propósitos:

- a) detectar el potencial terapéutico de drogas específicas para el tratamiento de estos desordenes
- b) proporcionar datos relevantes acerca de los mecanismos de acción de dichos fármacos

- c) constituir una herramienta para la determinación de los sustratos neurobiológicos de los trastornos psiquiátricos.

La contribución de los modelos animales a la neurobiología de los trastornos psiquiátricos depende de su validez, Willer propone tres criterios de validez que permiten calificar a los modelos animales.

- a) El concepto de validez predictiva, implica que los fármacos que modifican el estado patológico en los humanos también deben hacerlo en el modelo animal, cubriendo los requisitos de sensibilidad, selectividad y potencia relativa.
- b) La validez de apariencia, se refiere a la similitud fenomenológica entre el modelo y el trastorno modelado, se propone que el modelo debe de mostrar los síntomas más representativos del trastorno y no los síntomas secundarios.
- c) La validez de constructo o validez hipotética, este criterio establece que la hipótesis que explica el trastorno psiquiátrico también deben servir como fundamento del modelo.

En psicosis se han propuesto varios modelos, para tratar de representar el síndrome psicótico en los roedores se han empleado varias pruebas conductuales, como las que se describen a continuación:

- a) Hiperlocomoción: los cambios de actividad locomotora se han realizado en modelos esquizofrénicos en roedores y los efectos con antipsicóticos, en general el roedor incrementa su capacidad locomotora cuando presente el estado psicótico y se inhibe o reduce al suministrarle antipsicóticos.
- b) Habitación: Esta prueba se refiere a la capacidad de respuesta del roedor a estímulos o condiciones no habituales (estímulos táctiles o acústicos), en pacientes con psicosis hay un detrimento de la habitación.
- c) Inhibición del prepulso: esta prueba es un paradigma en donde se da un preestímulo acústico de 30 a 500 milisegundos antes de otro estímulo con mayor potencia, los pacientes con psicosis no son capaces de filtrar este estímulo, por lo que denotan sorpresa con ambos, en los roedores se ha visto que la reacción al estímulo es retardada.
- d) Sociabilidad: La psicosis es un estado que merma la calidad de vida del paciente, la sociabilidad se disminuye notablemente en los roedores, el

marcar su territorio es símbolo de poder, los roedores afectados no tratan de imponerse ante otro macho, simplemente pierden el interés.

Existen otras pruebas que se han validado en roedores con otros desórdenes como el modelo de nado forzado para depresión, en donde se observan conductas de inmovilidad homologas a la desesperanza. El modelo de enterramiento defensivo, que representa rasgos característicos en la ansiedad, las pruebas de repetición en laberintos para el trastorno obsesivo compulsivo, pruebas de memoria, para Alzheimer y esquizofrenia así como la perdida de memoria, entre otras.

Modelos animales en el estudio de esquizofrenia

La esquizofrenia es una de las enfermedades mentales con más alto costo para la sociedad, se encuentra en aproximadamente el 1% de la población mundial, generalmente se presenta en la etapa reproductiva del individuo, incidiendo en este, por toda su vida (16)(16)(16).

El estudio de las patologías psiquiátricas es complicado, no es posible estudiar el comportamiento de estas usando humanos como objeto de experimentación. Por ello los modelos animales son herramientas metodológicas de gran importancia en investigación.

El modelado de un trastorno humano como la esquizofrenia en animales implica varias dificultades, como simular síntomas representativos, la comunicación y el lenguaje. No obstante la necesidad de investigar este trastorno ha promovido varios modelos animales, en general estos modelos pueden dividirse en cuatro categorías: Los modelos animales para esquizofrenia inducidos a través de fármacos, por mutaciones o deleciones genéticas, a través de una lesión física o neurotóxica y a partir de implicaciones ambientales, obstétricas o deficiencia de nutrientes(17).

Uno de los modelos más usados para representar síntomas positivos en esquizofrenia es el inducido a través de fármacos, como anfetaminas del tipo de la fenciclidina, molécula no competitiva del receptor N-methyl-D-aspartato (NMDA), el cual induce síntomas parecidos a la esquizofrenia por el exceso de producción de dopamina farmacológica(18, 19). Otro ejemplo, es el trabajo en donde se indujo psicosis con baclofen, agonista de GABA, el cual provoca efectos parecidos a los síntomas de la psicosis, este se evaluó por medio de la prueba de inhibición del prepulso y por análisis de autoradiografía de los receptores C57BL/6J, modelo que útil para medir la patofisiología de la psicosis (20).

De igual manera un modelo de psicosis inducido con polyriboinosinic y polybocytidilic (compuestos parecidos a virus o bacterias patógenas que han sido involucradas en el etiología de la esquizofrenia) en el periodo prenatal y postnatal, pero los resultados demostraron que no se presentaron efectos en la inhibición del prepulso con respecto a los controles (Meyer et al 2006).

Los modelos animales y el sistema dopaminérgico

En otro experimento, realizaron la Delección del receptor D2 de dopamina en un roedor, la delación provocó ayudó a observar la afinidad de la dopamina a su ligando, sugiriendo que el receptor D2 tiene la función de regular de afinidad con los medicamentos antipsicóticos, por lo que es una buena opción para el estudio de las enfermedades mentales que involucran el sistema dopaminérgico(21). También se han realizado ratones mutantes para el gen del receptor D3, en donde observaron que la mutación de este incrementa espontáneamente la locomoción en el modelo (22).

La mutación del gen *rgs9* en el roedor provoca supersensibilidad de dopamina elevando la proporción de receptores, dopaminérgicos, caso similar en los esquizofrénicos, por lo que se cree que este pueda ser un buen modelo animal para el estudio de la enfermedad (23).

La mutación del transportador a dopamina (DAT) en el murino provocó incremento de la actividad locomotora, conductas similares a las provocadas por estimulantes, este modelo que podría ser de utilidad para padecimientos como Parkinson, esquizofrenia y déficit de atención (24).

Los modelos animales y las lesiones cerebrales:

Se ha sugerido que la esquizofrenia es producida por “lesiones” durante el desarrollo temprano del individuo, trayendo como consecuencia la reducción de las conexiones neuronales en algunas regiones cerebrales, como corteza prefrontal (produciendo probablemente los síntomas negativos de la enfermedad), así como la disminución de ciertas sinapsis en algunos sitios de proyección como en el cíngulo, corteza y estriado ventral (produciendo posiblemente a síntomas positivos (25). Los modelos animales para esquizofrenia que utilizan el concepto de lesiones cerebrales, pueden ser divididos en dos tipos, lesiones en edad adulta o en edad temprana.

En modelos animales que se les ha inducido esquizofrenia, a través de lesiones en el cerebro, reportan comportamientos similares a la enfermedad. La lesión en amígdala en rata adulta provoca hiperlocomoción e inhibición

del prepulso sensorial, además de que se ha observado incremento en el volumen ventricular (26). Otra lesión recurrente en ratas adultas para inducir esquizofrenia, es en la región prefrontal, provocando únicamente cambios en la locomoción(27). Sin embargo, en estos modelos no se observan otras conductas que simulan otros síntomas de la esquizofrenia, como, trastornos en la cognición o el comportamiento social.

Modelos animales en esquizofrenia y deleciones genéticas

Recientemente se realizó un trabajo en donde se provocaron síntomas parecidos a la psicosis con fenciclidina y la mutación del receptor zeta 1. Las evaluaciones conductuales se realizaron con varias pruebas, como nado forzado, sociabilidad, movimiento y evaluación de memoria; en donde se observó pérdida de memoria y sociabilidad por lo que este modelo combinado puede ser un candidato para la evaluación de efectos terapéuticos o para descifrar los mecanismos de la esquizofrenia (Enomoto et al 2007).

En otros modelos se han realizado mutaciones de genes relacionados con las vías de neurotransmisión involucradas en la enfermedad como la dopaminérgica, glutamatergica entre otras. Se realizó una mutación del receptor del gen *mGlu2/3*, además de adicionar un agonista a anfetaminas (LY3544740), se observó el incremento de la expresión del gen *mGlu3* en el hipocampo comparándolo con los controles, trabajo que ha servido para comprobar la importancia del hipocampo en la esquizofrenia (Linden et al 2006).

En ratones mutantes para el gen *reelin* (glicoproteína secretada por el telencéfalo por neuronas GABAérgicas), esta mutación provoca el decremento de aproximadamente el 50% en la expresión del gen, en el encéfalo, además de el silenciamiento de la proteína GAD67, lo que provoca deficiencia en la neurotransmisión de este sistema, por lo que se ha sugerido este modelo para el estudio de la etiología de la esquizofrenia (Turting et al 2006).

Otro de los modelos para el estudio de psicosis fue realizado con la deleción de una copia del cromosoma 22 (aproximadamente 30 genes), el modelo presentó características asociadas a la psicosis, como hiperlocomoción, por lo que se sugiere pueda ser un modelo candidato para el estudio de esta y otras padecimientos psiquiátricos (Jolin et al 2006).

Modelo con lesión neonatal en hipocampo ventral

El modelo de lesión en el hipocampo ventral de neonatos fue propuesto y probado por Lipska y colaboradores en 1993, en este modelo se reproducen algunos síntomas positivos y negativos de la esquizofrenia vistos en los pacientes, este modelo está basado en la hipótesis del neurodesarrollo, ya que la hipótesis postula que la migración neuronal es alterada desde el segundo trimestre de gestación, afectando el sistema dopaminérgico, además de varios de los sistemas de neurotransmisión, y expresión de proteínas y receptores, también alterados en esquizofrenia (28). Este modelo es ideal para comprender los mecanismos etiológicos de la enfermedad y la reversibilidad de los síntomas a través de tratamientos farmacológicos, pues se tiene ventaja de no utilizar fármacos, como en la mayoría de los modelos validados para el estudio de la psicosis.

Recientes estudios han establecido una alteración glutaminérgica en las ratas con lesión en el hipocampo ventral en neonatos debido que al administrar glicina, un co-agonista del receptor NMDA, mejora el déficit conductual y disminuye la actividad locomotora inducida por la administración de anfetaminas modelos de síntomas negativos primarios observados en esquizofrenia.

Descripción general del modelo

En 1992 se trabajó por primera vez con un modelo animal para esquizofrenia fundamentado en la hipótesis del neurodesarrollo, este modelo está basado en las consecuencias a largo plazo de una lesión de hipocampo ventral en ratas neonatos, este modelo propuesto por Lipska y coautores ofrece un constructo válido de esquizofrenia, ya que induce anormalidades conductuales post-puberales que simulan los síntomas positivos, negativos y cognitivos descritos en pacientes con esquizofrenia (tabla 1)(29).

Tabla 1.

Tabla comparativa entre los síntomas de la esquizofrenia y las características evaluadas en el modelo animal con lesión neonatal en hipocampo ventral

	<i>Modelo Lesión neonatal HV</i>	<i>Esquizofrenia</i>
Cambios conductuales	Hiperlocomoción con estrés	Susceptibilidad al estrés
	Decremento Inhibición del prepulso sensorial (PPI)	Decremento Inhibición del prepulso sensorial (PPI)
	Decremento en memoria de trabajo	Decremento en memoria de trabajo
	Decremento del tiempo de socialización	Reducción de contacto social
Respuesta farmacológica	Anfetaminas (Inducen hiperactividad)	Incrementos de síntomas positivos
	Apomorfina	Tolerancia a neurolépticos
	Induce movimientos estereotipados	
	MK-80 y PCP induce hiperactividad	Ketamina Incrementa síntomas positivos
Cambios moleculares (corteza prefrontal)	Decremento en los niveles de N-acetil aspartato	Decremento en los niveles de N-acetil aspartato
	Decremento en los niveles de Glutamato descarboxilasa-67	Decremento en los niveles de Glutamato descarboxilasa-67
	Decremento en los niveles de mRNA de factor neurotrófico cerebral	Decremento en los niveles de mRNA de factor neurotrófico cerebral

El modelo tiene la ventaja de no utilizar fármacos, como en la mayoría de los modelos utilizados en el estudio de la esquizofrenia y psicosis, por el contrario se induce con una pequeña lesión exitoxica (afectando cualquier tipo celular) en el cerebro inmaduro y neuroplástico de los animales, dando oportunidad a su posterior maduración y reacomodo de este.

Método de generación

Se realiza una lesión bilateral en el hipocampo ventral según método descrito anteriormente por Lipska et al en 1992. Los neonatos se anestesian por hipotermia con hielo durante 10-15 minutos. Posteriormente se les realiza una incisión en la piel del cráneo, con ayuda de un estereotáxico se localizan las coordenadas anteroposterior (AP) -3.0, mediolateral (ML) \pm 3.5, relativo a bregma, y dorsoventral (DV) -5.0 mm. Realizando una lesión bilateral con ácido iboténico o PBS para los animales falsamente lesionados.

Una vez recuperados de la operación regresan con su madre hasta el destete (21 días). Para ser sometidos a varios paradigmas y evaluar conductas parecidas a la esquizofrenia.

Animales: El modelo se ha estandarizado en ratas Wistar, estas son preñadas en el laboratorio, son separadas individualmente con ciclo invertido de 12 horas de luz oscuridad. De las camadas nacidas, son seleccionadas las crías, y entre los días 5-7 de nacidos se les realiza la lesión.

Se han realizado y analizado algunos parámetros en los animales a tomar en cuenta como:

- a) Edad: Los neonatos operados son regresados con su madre hasta el destete entre los 21-24 días, en donde son colocados en grupos.
- b) Posteriormente se han realizado pruebas conductuales y trabajos histológicos a diferentes edades, siendo las más estudiadas a los 35 y 56 días postnatal (prepuberales y pospuberales), aunque también se han realizado pruebas conductuales a los 70, y 90 días de edad.
- c) Tipo e intensidad de respuesta a estímulos:

En este modelo especialmente se ha evaluado la capacidad de reaccionar a estímulos acústicos por medio de la prueba de inhibición del prepulso sensorial, ya que se ha visto que disminuye la capacidad de respuesta, posiblemente por deficiencias en el filtraje auditivo.(30), como se ha visto en pacientes con esquizofrenia que tienen dificultades con el filtrado de sonidos.

También se ha evaluado la capacidad motriz después de realizada la lesión, ya que es necesario asegurarse de que la lesión no afecte otras zonas cerebrales relacionados con la locomoción y la motricidad.

- d) Comparación entre cepas de ratas: En 1995 Lipska y colaboradores realizaron la lesión en tres cepas de ratas distintas, la Sprague-Dawley (SD), Lewis y Fischer 344, cepas genéticamente distintas, con la finalidad de observar cambios conductuales entre estas, después de inducir daño en el hipocampo ventral con ácido iboténico en neonatos. Realizaron pruebas de conducta como actividad locomotora en dos edades distintas, a los 35 y 56 días postnatal, después de someterlas a las pruebas encontraron que la cepa SD es más reactiva a la locomoción en comparación con la F344. Los diferentes tipos de cepas tienen diferente susceptibilidad a los efectos de la lesión, posiblemente esta diferencia puede ser causada por las diferencias genéticas entre las cepas (31).
- e) Diferencia entre sexos: Se han realizado pocos trabajos entre ratas macho y ratas hembra.
En 2003 se realizó la comparación de ratas macho y hembra postpuberales (en el día 56) con lesión en el hipocampo ventral. Se realizaron pruebas de interacción social, y se encontró que el número de encuentros disminuye más en las hembras lesionadas que en los machos. También se realizó una prueba de memoria, en esta prueba se observó que disminuye la latencia exploratoria de los machos lesionados en comparación con hembras lesionadas, posiblemente estas diferencias se deba a los estrógenos, sin embargo, es necesario realizar más estudios sobre este apartado (32)
- f) Genómica: Se ha demostrado que el modelo muestra cambios moleculares, estos cambios se han estudiado principalmente en la región prefrontal, muestran que se encuentran disminuidos los niveles de N-acetil aspartato, Glutamato descarboxilasa-67 y de mRNA de factor neurotrófico cerebral, moléculas importantes en la neurotransmisión, en neurogénesis síntesis neuronal (33). Sin embargo es uno de los apartados menos explorados, por lo que es un campo abierto para la investigación.

Pruebas conductuales evaluadas en el modelo LHV:

El modelo de esquizofrenia producido por una lesión en el hipocampo ventral en neonatos, se ha sometido a varias pruebas conductuales para determinar un estado parecido a la esquizofrenia en el roedor, algunas de las pruebas pueden homologar conductas parecidas en el humano.

1. Actividad locomotora: La hiperlocomoción de los animales lesionados y falsamente lesionados es medida en su mayoría por medio de sensores o

fotoceldas, en cajas de actividad previamente seccionadas, en luz roja durante el ciclo invertido. En la prueba se mide el número de cruces que realiza el animal durante 5 minutos en la caja. En los animales lesionados se espera una hiperlocomoción, derivado probablemente por el exceso de dopamina en la región mesolímbica producido por la lesión.

La actividad locomotora es el parámetro que más se ha evaluado en el modelo de lesión en hipocampo ventral neonatal, se ha medido en varias edades (35, 56, 70, 86, y 150) algunos autores observan hiperlocomoción únicamente a los 56 días (34-37), y otros, en todas las edades en que se ha medido (36, 38-41).

2.- Prueba de memoria: Al modelo animal con lesión en hipocampo ventral neonatal se le ha evaluado memoria a partir del laberinto en "T" y por medio del laberinto elevado. Chambers en 1996 demostró la deficiencia de memoria, realizando pruebas de memoria mediante el laberinto en T, observó que los animales con lesión neonatal en hipocampo ventral de 35 y 56 días incrementaron el tiempo de exploración en el laberinto, al igual que la latencia (Chambers et al 1996). Lipska posteriormente observa por medio del laberinto en T, reducción significativa del tiempo de exploración de los animales neonatalmente lesionados en hipocampo ventral a las 6 semanas post operación, previo estrés por restricción de comida. En otro trabajo a los 56 días midieron memoria de trabajo mediante el laberinto elevado, en donde se encontró reducción de latencia en el grupo de animales adultos lesionados (42).

3.- interacción social: Uno de los síntomas negativos más representativos en la esquizofrenia, es el deterioro de la sociabilidad o la incapacidad de interacción social. Para la realización de esta prueba se introducen dos animales que no han interactuado previamente. Se coloca un animal lesionado y otro falsamente lesionado, en un cilindro transparente con luz blanca directa, y se gravan sus actividades durante 10 minutos. En esta prueba se toma en cuenta las habilidades sociales del animal, se mide el tiempo acumulado de interacción, es decir se acumula el tiempo en que el animal busca la atención del otro. Con el modelo con lesión en hipocampo ventral neonatal, se ha reportado reducción de la interacción social en animales lesionados, de 35 y 65 días de edad, realizando la prueba en una arena con luz roja durante 10 o 15 min (41, 43, 44). Sams-doot observó que a los 96 días no era significativa la reducción de la interacción social, sin embargo Beaker en 1999, observa reducción de la interacción social en ratas lesionadas en hipocampo ventral de 13 semanas post operación en una caja oscura durante 7 min; y a los 78 días post operación, otro grupo observó con un aislamiento más restringido, mayor reducción de interacción social en los animales lesionados (45).

4.- Inhibición del prepulso sensorial: La prueba de inhibición de prepulso evalúa la capacidad de respuesta ante el estímulo auditivo. En pacientes con esquizofrenia, se establece que los pacientes presentan reducción del prepulso sensorial posiblemente derivado de la dificultad de filtrar sonidos, a los animales adultos con lesión neonatal en hipocampo ventral, posiblemente también estamos viendo perdida la capacidad de filtrar sonidos. Esta prueba se ha realizado para evaluar el procesamiento auditivo, mide la capacidad de filtración auditiva en los animales, se ha visto que su capacidad de filtración esta alterada. El animal se somete a dos estímulos auditivos, en un animal normal se ha observado que la respuesta al segundo estímulo es menor que la respuesta la primero, y en animales lesionados al igual que en pacientes, la respuesta a los estímulos es igual, su capacidad de filtración auditivo esta alterado.

Esta prueba se ha evaluado en trabajos anteriores con animales lesionados neonatalmente en hipocampo ventral, la prueba se ha realizado en animales de varias edades (70, 100 y 120 días de edad) variando el nivel de decibeles y el tiempo de exposición al pulso y prepulso, encontrándose inhibición en la mayoría de las variables (46-49).

¿Es posible que la lesión en el hipocampo ventral en los neonatos modifique la conducta de ratas adultas?

Se ha logrado comprobar que la lesión provocada en el neonato modifica la conducta en los animales, la conducta que se ha observado en las ratas adulto es similar a algunos síntomas que se presentan en pacientes que padecen esquizofrenia.

Una de las conductas más representativas es el estrés, el animal se observa nervioso e inestable, los animales lesionados muestran un grado alto de estrés mostrado en las pruebas de locomoción en campo abierto, a diferencia de los animales falsamente lesionados (sham).

Otra de la conducta que se ve afectada es la habilidad social, el animal lesionado no es capaz de socializar frente a otro animal, este se percibe temeroso ante el otro. Se ha reportado que los animales lesionados pierden la capacidad de interactuar con otro animal, esta habilidad la pierden comparada con los animales falsamente lesionados.

Las capacidades cognitivas también se ven mermadas, se ha demostrado que se ve afectada su memoria de trabajo, los animales lesionados no son capaces de reconocer objetos que ya se les habían mostrado con anterioridad, así como algunas actividades cognitivas, reflejas en la inhibición del prepulso sensorial.

Semejanzas del modelo con la enfermedad en el humano

En el año 2000 Lipska y colaboradores realizaron un comparativo entre las características del modelo animal y la esquizofrenia. Tomando en cuenta: conducta, respuesta farmacológica y respuestas moleculares involucradas en esquizofrenia, estos se resume en la Tabla 1.

En el modelo se ha observado una de las características clásicas, observables en los modelos farmacológicos y genéticos, la prueba de locomoción, se ha visto que se observa hiperlocomoción en varias edades en el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral, comparando la conducta con el hiperreacción al estrés que se presenta en los pacientes.

Este modelo es importante porque es capaz de reproducir algunos de los síntomas negativos que se observan en los pacientes con esquizofrenia como, anhedonia, abulia, y la pérdida de la sociabilidad, que en el modelo se evalúa con la prueba de interacción social y donde se ha visto un decremento importante de la sociabilidad en los animales lesionados neonatalmente en hipocampo ventral.

Así como la pérdida cognitiva que también se presenta en los pacientes, en el modelo se evalúa con pruebas que miden memoria de trabajo, se ha encontrado que se reduce la memoria de trabajo considerablemente en los animales lesionados.

A nivel farmacológico el modelo se comporta de manera similar que los pacientes, se a los animales lesionados neonatalmente en hipocampo ventral, se les administra un agonista como anfetaminas o fenilciclidinas se exacerbaban las conductas psicóticas, se presenta más hiperlocomoción, deficiencia de memoria y pérdida de la interacción social y si se le administra un antipsicótico las conductas se controlan, se reduce la hiperlocomoción, la interacción social incrementa al igual que la memoria.

A nivel molecular se ha estudiado algunas moléculas que han sido relacionadas con esquizofrenia, como glutamato descarboxilasa 67 (que actúa en la cascada de señalización) N. acetil aspartato (importante en la ruta del glutamato), el factor neurotrófico cerebral, relacionado en neurogénesis, sin embargo a nivel molecular falta mucho por investigar.

La evaluación de estos síntomas negativos es importante porque en la mayoría de los modelos animales para esquizofrenia no se observan y el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral se puede observar todos, por lo que tiene la posibilidad de compararse conductualmente, farmacológica y molecularmente con los pacientes.

Validación del modelo

El modelo fue validado en el año 2000, mostrando que cumple con los tres criterios más importantes a saber en modelos animales.

- a) **Validez predictiva:** Se conoce como la respuesta a los tratamientos farmacológicos, es de suma importancia saber que el modelo responda a fármacos, de manera similar a como respondería el paciente con esquizofrenia. Ya que es una herramienta indispensable para probar y valorar medicamentos antes de salir al mercado. Se han realizado varios trabajos, para comprobar la irreversibilidad del modelo, se les han aplicado fármacos como anfetaminas, estas exacerbaban la conducta de hiperlocomoción en el animal, revirtiéndolos al aplicar antipsicóticos, demostrando la reversibilidad del modelo (50).

Es importante saber si el modelo responde de manera similar o igual que el paciente, si este presenta sensibilidad farmacológica, y selectividad, ya que debe responder únicamente a antipsicóticos que reviertan las conductas antes evaluadas.

- b) **Validez de apariencia:** La validez de apariencia es uno de los criterios más fuertes que consolidan el modelo, se ha encontrado una buena similitud entre el modelo y la enfermedad, las pruebas conductuales a las que son sometidos los animales, muestra algunos de los síntomas más representativos del desorden. Se pueden observar algunos síntomas positivos (hiperlocomoción) y negativos (anhedonia, apatía), así como deficiencia en la filtración de las percepciones, y deterioro en la memoria.
- c) **Validez hipotética:** El modelo está sustentado sobre la hipótesis del neurodesarrollo, mostrando que el daño provocado en las primeras etapas de vida (estado neonato) puede afectar la conducta del individuo a largo plazo.

Limitantes del modelo

El modelo presenta algunas conductas que simulan síntomas de la esquizofrenia, sin embargo algunos autores creen que la esquizofrenia es una enfermedad necesariamente y exclusivamente del humano, como resultado de un proceso evolutivo adaptativo al ritmo de vida de las grandes ciudades.

No sabemos con certeza cuál es el origen de la enfermedad, sin embargo el modelo muestra algunas de las conductas representativas de la esquizofrenia, el daño provocado por una lesión durante el neurodesarrollo del cerebro, posiblemente provoca un daño a futuro en el cerebro inmaduro de la rata que se traducen en cambios conductuales y moleculares semejantes a algunos síntomas representativos de la enfermedad. Sin embargo no toma en cuenta, los factores estresores anteriores o posteriores al daño, durante o posterior a la operación, así como el riesgo genético, o algún otro factor que predisponga o provoque la enfermedad, como la neurodegeneración, como otra de las hipótesis que hoy están retomando fuerza.

Conclusiones

El cuidado de los animales debe tener un capítulo importante en la bioética, si bien algunos aspectos de la investigación biomédica actualmente esta dependiendo cada vez menos del animal vivo y buena parte del trabajo se esta realizando en preparaciones aisladas, aun es inevitable la etapa de experimentación animal.

De la misma manera no se puede evitar la prueba final en el propio ser humano, con todas las precauciones y el riesgo que nos merecen nuestros semejantes, ya que la investigación clínica en voluntarios informados sigue siendo indispensable antes de poner a disposición de la sociedad cualquier nuevo producto de progreso en medicina.

En la situación actual, lo más razonable es adoptar la postura intermedia de consolidar el uso de animales en investigación como necesario para ajustarse al imperativo moral de curar y prevenir enfermedades humanas, pero buscando formas de remplazar y reducir su número y disminuir su sufrimiento.

El modelo animal es un buen candidato para estudiar enfermedades humanas, para conocer la etiología y desarrollo de prácticamente cualquier enfermedad. El modelo animal con lesión neonatal en hipocampo ventral simula síntomas y características conductuales más representativas en esquizofrenia. La reproducibilidad de este modelo para esquizofrenia es plausible, pues a partir de evaluar algunas de las pruebas y modelos conductuales se ha logrado mimetizar algunos de los síntomas más representativos de la enfermedad.

A través de la prueba de actividad locomotora se ha logrado observar el incremento en locomoción en animales lesionados en comparación con los falsamente lesionados, la hiperactividad mostrada se ha asociado a los síntomas positivos de la enfermedad. La prueba de interacción social muestra signos

negativos de la enfermedad, está perdida de esta habilidad, es posible que el animal muestre miedo o incapacidad de interaccionar con el otro, característica distintiva en pacientes con la enfermedad.

En la prueba de memoria se observa algo similar, la pérdida de memoria en el grupo lesionado, está perdida se ha asociado a la pérdida de capacidades cognitivas en pacientes.

Este y otros modelos animales nos permiten modular paso a paso algunas de los síntomas y características de las enfermedades, simulando con mayor exactitud las condiciones de los pacientes, condición que nos permitirá estudiar los elementos moleculares y genómicos alterados en los pacientes.

Estas conductas reproducibles en los modelos animales nos pueden ayudar, también a entender algunos de los mecanismos adaptativos en el cerebro para entender y contribuir a la atención y diagnóstico de las enfermedades.

Bibliografía

- ADOLPHE M., Parodi A.L. [Ethical issues in animal experimentation]. *Bull Acad Natl Med.* 2009 Nov;193(8):1803-4.
- KOPALADZE R.A. [Bioethics and biomedical experiment evolution from Alkmaion to Pavlov. Dedicated to 160 years since I.P. Pavlov's birthday]. *Usp Fiziol Nauk.* 2009 Jul-Sep;40(3):89-104.
- PARODI A.L. [Ethical issue in animal experimentation]. *Bull Acad Natl Med.* 2009 Nov;193(8):1737-45; discussion 46.
- REZNIKOV A.G. [Bioethical aspects of experiments on the animals]. *Klin Khir.* Jun(6):8-13.
- SUGHRUE M.E., Mocco J., Mack W.J., Ducruet A.F., Komotar R.J., Fischbach R.L., et al. Bioethical considerations in translational research: primate stroke. *Am J Bioeth.* 2009 May;9(5):3-12.
- STREIFFER R. Animal biotechnology and the non-identity problem. *Am J Bioeth.* 2008 Jun;8(6):47-8.
- COLLINS K.A., Westra H.A., Dozois D.J., Stewart S.H. The validity of the brief version of the Fear of Negative Evaluation Scale. *J Anxiety Disord.* 2005;19(3):345-59.
- JORQUI-AZOFRA M., Romeo-Casabona C.M. Some ethical aspects of xenotransplantation in light of the proposed European directive on the protection of animals used for scientific purposes. *Transplant Proc.* Jul-Aug;42(6):2122-5.
- IZMIRLI S., Aldavood S.J., Yasar A., Phillips C.J. Introducing ethical evaluation of the use of animals in experiments in the Near East. *Altern Lab Anim.* Aug;38(4):331-6.
- KARAPOLAT S. The use of animals in experimental studies. *J Bras Pneumol.* 2008 Nov;34(11):989; author reply 90.
- PORSOLT R.D. Historical perspective on CMS model. *Psychopharmacology (Berl).* 1997 Dec;134(4):363-4; discussion 71-7.

- SIEGEL S. Pavlovian conditioning analysis of morphine tolerance. *NIDA Res Monogr.* 1978(18):27-53.
- ALEMAN A., Kahn R.S. Strange feelings: do amygdala abnormalities dysregulate the emotional brain in schizophrenia? *Prog Neurobiol.* 2005 Dec;77(5):283-98.
- BEN-SHACHAR D., Nadri C., Karry R., Agam G. Mitochondrial complex I subunits are altered in rats with neonatal ventral hippocampal damage but not in rats exposed to oxygen restriction at neonatal age. *J Mol Neurosci.* 2009 Jun;38(2):143-51.
- BERNSTEIN H.G., Lendeckel U., Dobrowolny H., Stauch R., Steiner J., Grecksch G., et al. Beacon-like/ubiquitin-5-like immunoreactivity is highly expressed in human hypothalamus and increased in haloperidol-treated schizophrenics and a rat model of schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology.* 2008 Apr;33(3):340-51.
- GWON H.C., Choi S.H., Song Y.B., Hahn J.Y., Jeong M.H., Seong I.W., et al. Long-term clinical results and predictors of adverse outcomes after drug-eluting stent implantation for bifurcation lesions in a real-world practice: the COBIS (Coronary Bifurcation Stenting) registry. *Circ J.* 2010 Nov;74(11):2322-8.
- BERTRAND J.B., Langlois J.B., Begou M., Volle J., Brun P., d'Amato T., et al. Longitudinal MRI monitoring of brain damage in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of schizophrenia. *Hippocampus.* Feb;20(2):264-78.
- VOHS J.L., Chambers R.A., Krishnan G.P., O'Donnell B.F., Berg S., Morzorati S.L. GABAergic modulation of the 40 Hz auditory steady-state response in a rat model of schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol.* May;13(4):487-97.
- LABRIE V., Lipina T., Roder J.C. Mice with reduced NMDA receptor glycine affinity model some of the negative and cognitive symptoms of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl).* 2008 Oct;200(2):217-30.
- LACHAPPELLE F. [Replacing EC directive 86/609]. *Bull Acad Natl Med.* 2009 Nov;193(8):1793-802.
- LINDSTROM L.H. Schizophrenia, the dopamine hypothesis and alpha2-adrenoceptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci.* 2000 Jun;21(6):198-9.
- GOTO Y., Grace A.A. The dopamine system and the pathophysiology of schizophrenia: a basic science perspective. *Int Rev Neurobiol.* 2007;78:41-68.

- SEEMAN P., Ko F., Jack E., Greenstein R., Dean B. Consistent with dopamine supersensitivity, RGS9 expression is diminished in the amphetamine-treated animal model of schizophrenia and in postmortem schizophrenia brain. *Synapse*. 2007 May;61(5):303-9.
- INADA T., Nakamura A., Iijima Y. Relationship between catechol-O-methyltransferase polymorphism and treatment-resistant schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2003 Jul 1;120B(1):35-9.
- TSENG K.Y., Lewis B.L., Lipska B.K., O'Donnell P. Post-pubertal disruption of medial prefrontal cortical dopamine-glutamate interactions in a developmental animal model of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2007 Oct 1;62(7):730-8.
- DEAN B., Bradbury R., Copolov D.L. Cannabis-sensitive dopaminergic markers in postmortem central nervous system: changes in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2003 Apr 1;53(7):585-92.
- GOTO Y., O'Donnell P. Prefrontal lesion reverses abnormal mesoaccumbens response in an animal model of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2004 Jan 15;55(2):172-6.
- LIPSKA B.K. Using animal models to test a neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci*. 2004 Jul;29(4):282-6.
- LIPSKA B.K., Jaskiw G.E., Chrapusta S., Karoum F., Weinberger D.R. Ibotenic acid lesion of the ventral hippocampus differentially affects dopamine and its metabolites in the nucleus accumbens and prefrontal cortex in the rat. *Brain Res*. 1992 Jul 10;585(1-2):1-6.
- LIPSKA B.K., Weinberger D.R. Prefrontal cortical and hippocampal modulation of dopamine-mediated effects. *Adv Pharmacol*. 1998;42:806-9.
- LIPSKA B.K., Weinberger D.R. Genetic variation in vulnerability to the behavioral effects of neonatal hippocampal damage in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 12;92(19):8906-10.
- LIPSKA B.K., Lerman D.N., Khaing Z.Z., Weinberger D.R. The neonatal ventral hippocampal lesion model of schizophrenia: effects on dopamine and GABA mRNA markers in the rat midbrain. *Eur J Neurosci*. 2003 Dec;18(11):3097-104.
- LIPSKA B.K., Weinberger D.R. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology*. 2000 Sep;23(3):223-39.

- LIPSKA B.K., Jaskiw G.E., Weinberger D.R. Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: a potential animal model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 1993 Aug;9(1):67-75.
- FLORES G., Barbeau D., Quirion R., Srivastava L.K. Decreased binding of dopamine D3 receptors in limbic subregions after neonatal bilateral lesion of rat hippocampus. *J Neurosci*. 1996 Mar 15;16(6):2020-6.
- LE PEN G., Gaudet L., Mortas P., Mory R., Moreau J.L. Deficits in reward sensitivity in a neurodevelopmental rat model of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002 Jun;161(4):434-41.
- SUMIYOSHI T., Tsunoda M., Uehara T., Tanaka K., Itoh H., Sumiyoshi C., et al. Enhanced locomotor activity in rats with excitotoxic lesions of the entorhinal cortex, a neurodevelopmental animal model of schizophrenia: behavioral and in vivo microdialysis studies. *Neurosci Lett*. 2004 Jul 1;364(2):124-9.
- WOOD G.K., Lipska B.K., Weinberger D.R. Behavioral changes in rats with early ventral hippocampal damage vary with age at damage. *Brain Res Dev Brain Res*. 1997 Jul 18;101(1-2):17-25.
- LIPSKA B.K., al-Amin H.A., Weinberger D.R. Excitotoxic lesions of the rat medial prefrontal cortex. Effects on abnormal behaviors associated with neonatal hippocampal damage. *Neuropsychopharmacology*. 1998 Dec;19(6):451-64.
- AL-AMIN H.A., Shannon Weickert C., Weinberger D.R., Lipska B.K. Delayed onset of enhanced MK-801-induced motor hyperactivity after neonatal lesions of the rat ventral hippocampus. *Biol Psychiatry*. 2001 Mar 15;49(6):528-39.
- LIPSKA B.K., Halim N.D., Segal P.N., Weinberger D.R. Effects of reversible inactivation of the neonatal ventral hippocampus on behavior in the adult rat. *J Neurosci*. 2002 Apr 1;22(7):2835-42.
- WOOD G.K., Quirion R., Srivastava L.K. Early environment contributes to developmental disruption of MPFC after neonatal ventral hippocampal lesions in rats. *Synapse*. 2003 Dec 1;50(3):223-32.
- SAMS-DODD F., Lipska B.K., Weinberger D.R. Neonatal lesions of the rat ventral hippocampus result in hyperlocomotion and deficits in social behaviour in adulthood. *Psychopharmacology (Berl)*. 1997 Aug;132(3):303-10.

- BECKER A., Grecksch G., Bernstein H.G., Hollt V., Bogerts B. Social behaviour in rats lesioned with ibotenic acid in the hippocampus: quantitative and qualitative analysis. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999 Jun;144(4):333-8.
- ALQUICER G., Silva-Gomez A.B., Peralta F., Flores G. Neonatal ventral hippocampus lesion alters the dopamine content in the limbic regions in postpubertal rats. *Int J Dev Neurosci*. 2004 Apr;22(2):103-11.
- LE PEN G., Moreau J.L. Disruption of prepulse inhibition of startle reflex in a neurodevelopmental model of schizophrenia: reversal by clozapine, olanzapine and risperidone but not by haloperidol. *Neuropsychopharmacology*. 2002 Jul;27(1):1-11.
- WOLF R., Matzke K., Paelchen K., Dobrowolny H., Bogerts B., Schwegler H. Reduction of Prepulse Inhibition (PPI) after neonatal excitotoxic lesion of the ventral thalamus in pubertal and adult rats. *Pharmacopsychiatry*. May;43(3):99-109.
- WEINER I. The “two-headed” latent inhibition model of schizophrenia: modeling positive and negative symptoms and their treatment. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003 Sep;169(3-4):257-97.
49. Vohs J.L., Chambers R.A., Krishnan G.P., O'Donnell B.F., Hetrick W.P., KAISER S.T., et al. Auditory sensory gating in the neonatal ventral hippocampal lesion model of schizophrenia. *Neuropsychobiology*. 2009;60(1):12-22.
- XU R., Hranilovic D., Fetsko L.A., Bucan M., Wang Y. Dopamine D2S and D2L receptors may differentially contribute to the actions of antipsychotic and psychotic agents in mice. *Mol Psychiatry*. 2002;7(10):1075-82.

Índice

PRÓLOGO.....	5
Capítulo I	
GENÓMICA.....	7
DNA y genes.....	8
Librerías de DNA o genotecas.....	10
Genómica estructural y funcional.....	11
Proyectos genoma.....	11
La era de la genómica.....	12
El proyecto del genoma humano.....	13
Capítulo II	
LA TRANSCRIPTÓMICA: APLICACIÓN EN ENFERMEDADES COMUNES.....	15
Introducción.....	15
Características del RNA.....	16
Estructura y plegamiento del RNA.....	18
Generalidades del RNAm.....	19
La transcripción génica.....	20
Corte y empalme (splicing alternativo).....	22
Traducción del RNAm.....	24
Variantes genéticas que afectan al RNAm.....	28
De la expresión génica de genes aislados a la transcriptómica.....	30
Herramientas moleculares empleadas en transcriptómica.....	31
Fundamentos de los microarreglos de expresión.....	33
Affymetrix.....	35
Illumina.....	36

Utilidad de la transcriptómica en enfermedades comunes:	
Hipertensión arterial, obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y artritis reumatoide.....	37
Transcriptómica en hipertensión arterial.....	37
Transcriptómica en obesidad.....	38
Transcriptómica en DMT2.....	40
Transcriptómica en AR.....	41
Perspectivas.....	44
Bibliografía.....	45

Capítulo III

PROTEÓMICA.....	53
Introducción.....	53
Definición y tipos de proteómica.....	54
Proteómica de expresión.....	54
Proteómica funcional.....	54
Proteómica del mapa celular o estructural.....	54
Plataforma de las tecnologías proteómicas.....	55
Electroforesis de doble dimensión (2D-PAGE).....	55
Espectrometría de masas.....	57
Ionización de la muestra para análisis proteómico.....	59
Método de ionización tipo MALDI.....	59
Método de ionización tipo ESI (Electrospray Ionization).....	60
Análisis de masa.....	61
Analizadores de cuadrupolo.....	61
Aplicaciones de la proteómica.....	62
Bibliografía.....	65

Capítulo IV

MUTAGÉNESIS.....	67
Antecedentes históricos.....	68
Mutación.....	71
Clasificación de las mutaciones según el tipo de célula.....	71
Clasificación de las mutaciones según el tamaño de la secuencia de DNA afectada.....	72
Expansión por repetición de trinucleótidos.....	86
Tasas de mutaciones.....	87

Mecanismos mutagénicos.....	88
Mutaciones espontáneas.....	88
Cambios químicos espontáneos.....	89
Mutaciones inducidas químicamente.....	90
Análogos de bases.....	90
Agentes alquilantes.....	91
Desaminación.....	91
Hidroxilamina.....	92
Reacciones oxidativas.....	92
Agentes intercalantes.....	93
Radiación.....	94
Elementos transponibles [29].....	94
Efectos mutagénicos de la transposición.....	97
Mutaciones en humanos.....	98
Los tipos sanguíneos ABO.....	98
La distrofia muscular.....	98
Detección de mutaciones.....	99
Detección en microorganismos.....	99
Detección en plantas.....	99
Detección en la especie humana.....	100
Datos relevantes en toxicología genética.....	101
Mutaciones germinales en humanos.....	101
Mutaciones germinales en ratones.....	102
Mutaciones somáticas (estudios <i>in vivo</i>).....	103
Mutaciones somáticas (estudios <i>in vitro</i>).....	105
Evaluación del riesgo genético humano.....	105
Ensayos para la detección de genotoxinas.....	106
Reversiones frente a mutaciones directas.....	106
Ensayo His.....	107
Ensayo Ara.....	112
Estirpes sensibles a grupos específicos de mutágenos.....	114
Valor predictivo de los ensayos bacterianos de mutagénesis.....	115
Ensayos genotóxicos no mutagénicos.....	118
Conviviendo con mutágenos.....	124
Productos industriales.....	124
Pesticidas.....	126
Fármacos y drogas.....	128

Alimentos y aditivos de la alimentación.....	129
Recomendaciones básicas.....	131
Bibliografía.....	132
Capítulo V	
FENÓMICA.....	137
Caracterización fenotípica a gran escala.....	137
¿Qué es la fenomica?.....	137
Herramienta clave para la caracterización fenotípica: La genómica.....	138
Proyectos actuales de fenomas.....	140
La fenomica en medicina.....	143
Genética cuantitativa asociada a la interacción del genoma y el ambiente.....	148
La naturaleza de las características continuas.....	148
Aspectos estudiados en la genética cuantitativa.....	149
La herencia en las características continuas.....	150
Hipótesis poligénica de la herencia cuantitativa.....	150
Hipótesis poligénica para el color de la semilla del trigo.....	151
Herramientas estadísticas.....	152
Muestras y poblaciones.....	153
Distribuciones.....	154
Medida de tendencia central, la media.....	155
Medidas de dispersión. La varianza y desviación estándar.....	155
Correlación.....	157
Regresión.....	159
Análisis de varianza.....	159
Heredabilidad.....	160
Componentes de la variación fenotípica.....	161
Heredabilidad en sentido amplio y sentido estrecho.....	165
Comprendiendo la heredabilidad.....	166
¿Cómo se calcula la heredabilidad?.....	167
Fórmula, un padre-descendencia.....	168
Respuesta a la selección.....	171
Estimando la respuesta de la selección.....	171
Correlaciones Genéticas.....	172
Loci de características cuantitativas.....	175

El mapeo de genomas.....	175
Mapeo genético: Un resumen histórico.....	176
Mapeo Genético: Estrategias generales.....	177
Marcadores de DNA para el mapeo genético.....	178
Polimorfismo de fragmentos grandes de restricción (RFLP's).....	178
Polimorfismo de nucleótido sencillo.....	181
Mapeo de poblaciones.....	182
El análisis de ligamiento es la base del mapeo genético.....	183
El ligamiento parcial es explicado por el comportamiento de los cromosomas durante la meiosis.....	186
Del ligamiento parcial al mapeo genético.....	190
Distancia Genética de un <i>loci</i>	191
Ligamiento genético en programas de mejoramiento.....	191
Interpretación de un mapa de ligamiento genético.....	192
La cobertura óptima de un mapa genético.....	193
Aplicación de mapas genéticos.....	193
Detección de <i>loci</i> por características sencillas heredadas.....	193
Detección de <i>loci</i> de caracteres cuantitativos (QTL).....	194
Mapeo de alta resolución.....	194
Mapeo comparativo.....	195
Mapeo físico.....	197
Mapeo de restricción.....	198
Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	198
Mapeo por etiquetado de secuencia.....	198
Bibliografía.....	201
 Capítulo VI	
GENÓMICA FORENSE.....	205
Introducción.....	205
Antecedentes.....	207
Métodos de extracción.....	207
Extracción orgánica.....	208
Tarjetas FTA™.....	209
El uso de la Sílica.....	209
Chelex.....	210
DNA IQ.....	211
Extracción diferencial.....	211

Marcadores de uso forense.....	212
Primeros marcadores genéticos.....	212
Huella genética de DNA por múltiples <i>locus</i> (DNA Fingerprints multilocus).....	213
Huella genética de DNA por un sólo <i>locus</i> (DNA Fingerprints unilocus).....	214
Métodos basados en PCR.....	215
Métodos actuales en la identificación humana.....	216
Perfiles de STR´s autosomales.....	217
SNP´s autosomales.....	219
Cromosoma Y.....	220
DNA Mitocondrial.....	221
Aplicación de la genómica.....	222
Deducción de la población de origen.....	223
Información fenotípica.....	224
Genética forense en especies diferentes a la humana.....	225
Contribución de la genómica para progresos futuros.....	226
Bibliografía.....	228

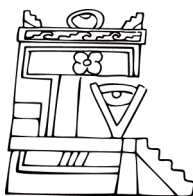
Capítulo VII

MÉTODOS COMPUTACIONALES EN BIOINFORMÁTICA.....	231
La biología celular asistida por computadora.....	232
La necesidad de almacenar información.....	233
La necesidad de recuperar información.....	234
El lenguaje de consulta.....	234
La recuperación de la información.....	235
La necesidad de analizar información.....	235
Bioinformática en una computadora portatil.....	237
Herramientas de software necesarias.....	239
Las búsquedas especializadas.....	240
Ejemplo de interacción en el portal de información de NCBI.....	241
Interacción hombre-máquina.....	248
Bibliografía.....	252

Capítulo VIII

MODELOS ANIMALES Y GENÓMICA.....	255
Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas.....	257
Modelos animales y sufrimiento.....	259
Evaluación ética.....	260
El manejo de animales en investigación.....	261
Captura, transporte y cautiverio.....	262
Manejo en el laboratorio.....	262
Procedimientos de anestesia.....	263
Eutanasia.....	264
Enfoque histórico de la investigación en animales.....	264
Modelos animales en psicología.....	266
Paradigmas y modelos conductuales.....	269
• Paradigma del campo abierto.....	270
• Paradigma del intruso en la colonia.....	270
• Paradigma del laberinto elevado en forma de cruz.....	271
• Paradigma del comportamiento pavloviano.....	271
• Paradigma del condicionamiento operante.....	272
• Paradigma de la autoestimulación.....	272
• Paradigma de la autoadministración de drogas.....	273
• Paradigma de la aversión condicionada al sabor.....	273
• Paradigma del laberinto de brazo radial.....	273
• Paradigma del laberinto de agua.....	274
• Paradigma del enterramiento defensivo condicionado.....	274
Modelos animales en psiquiatría.....	274
Lesiones cerebrales.....	275
Modelos animales y la psiquiatría.....	276
Modelos animales en el estudio de esquizofrenia.....	278
Los modelos animales y el sistema dopaminérgico.....	279
Modelos animales en esquizofrenia y deleciones genéticas.....	280
Modelo con lesión neonatal en hipocampo ventral.....	281
Descripción general del modelo.....	281
Método de generación.....	283
Pruebas conductuales evaluadas en el modelo LHV.....	284
Actividad locomotora.....	284
Prueba de memoria.....	285

Interacción social.....	285
Inhibición de prepulso sensorial.....	286
¿Es posible que la lesión en el hipocampo ventral en los neonatos modifique la conducta de ratas adultas?.....	286
Semejanzas del modelo con la enfermedad en el humano.....	287
Validación del modelo.....	288
a) Validez predictiva.....	288
b) Validez de apariencia.....	288
c) Validez hipotética.....	288
Limitantes del modelo.....	288
Conclusiones.....	289
Bibliografía.....	291



Difusión y Divulgación
Científica y Tecnológica

José Manuel Piña Gutiérrez

Rector

Wilfrido Miguel Contreras Sánchez

Secretario de Investigación, Posgrado y Vinculación

Fabián Chablé Falcón

Director de Difusión y Divulgación Científica y Tecnológica

Francisco Morales Hoil

Jefe del Departamento Editorial de Publicaciones No Periódicas

Esta obra se terminó de imprimir el 30 de mayo de 2013, con un tiraje de 1000 ejemplares. Impreso en los Talleres de Lito-Grapo; Calle Colima #35, Colonia Progreso; Delegación Alvaro Obregón; C. P. 01080 México, D. F., México. El cuidado estuvo a cargo de los autores y del Departamento Editorial de Publicaciones No Periódicas de la Dirección de Difusión y Divulgación Científica y Tecnológica de la UJAT.