

## LA NEUROGENETICA: PASADO, PRESENTE Y FUTURO

Por LUIS TRELLES\* y MARIA DE LOS ANGELES QUESADA G.\*\*

### RESUMEN

*La genética en general y la neurogenética en particular han tenido en los últimos años un espectacular desarrollo, que se expone de manera esquemática. Para ello se divide el artículo en tres fases: el pasado, el presente y el futuro. En la primera se describe la historia de la neurogenética; en la segunda se describe los métodos de la genética molecular que han permitido su actual desarrollo y se resume los hallazgos sobre algunas enfermedades como la enfermedad de Duchenne. La tercera parte trata sobre las implicancias futuras que tendrá la neurogenética.*

### SUMMARY

*Following an historical planning an introduction to neurogenetics is made. The molecular technics are explained and their clinical application discussed. Future is seen as an era of genetic therapy using gene transplants and the production of substances by recombinant DNA.*

**PALABRAS CLAVE:** Neurogenética, genética molecular, ADN, ARN, polimorfismo de restricción de talla, Southern blot, diagnóstico prenatal, Duchenne, Huntington, Alzheimer, polineuropatía amiloidótica.

**KEY WORDS:** Neurogenetics, molecular genetics, ADN, ARN, restriction fragment length polymorphism, Southern blot, prenatal diagnosis, neurophysiology and genetics, reverse genetics, Duchenne dystrophie, Huntington disease, Alzheimer disease, amiloidotic polyneuropathy.

---

\* Profesor de Neurología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Jefe del Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas.

\*\* Residente de Neurología, Universidad de Sevilla, España.

## INTRODUCCION

La neurogenética estudia la estructura y el funcionamiento de los ácidos nucleicos en las neuronas y la glía. Es una de las neurociencias más pujantes y dinámicas, su campo abarca aspectos normales y patológicos. La medicina se interesa sobretudo por ésta última vertiente, pero el estudio de la función normal de los genes hace posible un verdadero conocimiento de su patología.

La neurogenética comprende múltiples campos:

1) El programa genético de la diferenciación neuronal, glial y del desarrollo del sistema nervioso.

2) El estudio (la localización cromosómica, el secuenciamiento y la regulación) de los genes cuyos productos son específicos del sistema nervioso. Para ello es indispensable la identificación y el aislamiento de los ARNm específicos del sistema nervioso, seguidos del clonaje y la creación de librerías de ADN complementario (cADN). En efecto, una vez identificado un ARNm, se puede construir con la transcriptasa inversa un ADN que le sea complementario, el que introducido en una bacteria puede clonarse, pues la reproducción bacteriana origina una "n" cantidad de microorganismos, cada uno de los cuales contiene el fragmento de ADN. Luego, éste puede transcribirse y traducirse en la proteína correspondiente, con el uso de técnicas apropiadas.

3) La determinación de la función de las proteínas específicas del sistema nervioso mediante:

- el secuenciamiento protéico a partir del conocimiento del código del ADN que codifica para la proteína;

- la traducción experimental del ARNm, cuya proteína se quiere estudiar, que se puede hacer en el oocito del *xenopus*. Se produce así un huevo artificial que contiene la proteína en cuestión. De esta manera se puede estudiar su función en el oocito, que habitualmente reproduce la que tiene en la neurona.

- el uso de la manipulación genética (mutaciones guiadas) permite determinar la función de los diferentes dominios de la proteína. En efecto, al modificar un segmento del código de un gen, se cambia la secuencia de aminoácidos de la proteína y así se puede determinar la función del segmento modificado.

4) Las técnicas de recombinación del ADN usadas para aislar proteínas específicas del SN. Por ejemplo neuropéptidos.

5) Los aspectos genéticos de las enfermedades hereditarias: la forma de transmisión mendeliana, la localización cromosómica del gen, su secuenciamiento y estructura normal, sus tipos de mutación, la proteína para la que codifica y su función. Las posibilidades terapéuticas: el consejo, la terapia de sustitución y la transferencia de genes.

6) Las anomalías cromosómicas, que no contemplaremos en este artículo.

7) Los métodos de diagnóstico que no se originan en técnicas de genética molecular y de recombinación del ADN.

8) El estudio de modelos animales de las enfermedades genéticas. Pueden ser naturales o creados artificialmente por mutaciones dirigidas o bajo la forma de animales transgénicos.

9) La producción por ingeniería genética de sustancias específicas del sistema nervioso y de medicamentos neuroactivos.

Teniendo en cuenta todos estos factores, seguiremos a lo largo del presente trabajo, un plano histórico:

a) El pasado remoto: que comprenderá desde el año 1860 hasta la segunda guerra mundial. Es decir, desde la descripción de las primeras enfermedades genéticas (DUCHENNE, FRIEDREICH) y los trabajos de MENDEL, hasta la identificación de los ácidos nucleicos como el material genético, por AVERY, MACLEOD & McCARTY en 1944.

b) Los antecedentes próximos, marcados por el desarrollo de la genética molecular y la descripción de los desórdenes enzimáticos de numerosas enfermedades recesivas, así como la identificación de las cromosopatías (*síndrome de Down* por ejemplo). Esta etapa va desde la Guerra Mundial hasta la década pasada en que se describen las técnicas de recombinación del ADN, las diferencias entre los genes procariotes y los eucariotes, los métodos de secuenciamiento del ADN y los polimorfismos de restricción.

c) El presente, en el que se da plena aplicación a la genética inversa, la ingeniería genética y las mutaciones dirigidas, para dilucidar la patología molecular de las enfermedades genéticas, para producir sustancias neuroactivas y para comprender la función de numerosas proteínas neuronales o gliales.

d) El futuro.

### EL PASADO REMOTO

Fijámonos el inicio de la neurogenética en la década de 1860, porque en ella se produjeron descripciones de vital importancia. DUCHENNE, en 1861 (ADAMS & VICTOR, 1981) o en 1868 (WALTON & GARDNER-MEDWIN, 1981), identificó la enfermedad que lleva su nombre. FRIEDREICH en 1861 (ADAMS & VICTOR, 1981) comenzó a describir la degeneración espino-cerebelosa. Gregor MENDEL publicó en 1865 el resultado de sus magistrales experimentos con arberjas (ROSEMBERG, 1986) y abrió el camino de la genética. MIESCHER en 1868 (BOULANGER *et al.*, 1962) aisló de los glóbulos blancos un constituyente rico en ácidos nucleicos al que llamó nucleína.

Desde el punto de vista neurológico, esa época fue la etapa anátomo-clínica, en la que se describió la mayoría de las enfermedades heredo-degenerativas y de los errores congénitos del metabolismo (TABLA I).

TABLA I

CRONOLOGIA DE LA DESCRIPCION DE ALGUNAS ENFERMEDADES GENETICAS		
DUCHENNE	1861	DISTROFIA MUSCULAR
FRIEDREICH	1863	ATAXIA ESPINO-CEREBELOSA
HUNTINGTON	1872	COREA
STRÜMPPELL	1880	PARAPLEJIA ESPASTICA
TAY-SACHS	1881 Y 1896	GANGLIOSIDOSIS GM2
GAUCHER	1882	GLUCOCEREBROCIDOSIS
CHARCOT-MARIE-TOOTH	1886	ATROFIA MUSCULAR PERONEA
MENZEL	1891	ATAXIA OLIVO-PONTO-CEREBELOSA
DEJERINE-SOTTAS	1893	NEUROPATIA HIPERTROFICA
BATTEN	1903	CEROIDO-LIPO-FUSCINOSIS
GORDON HOLMES	1907	ATAXIA CEREBELO-CORTICAL
STEINERT	1909	DISTROFIA MUSCULAR
LEUCODISTROFIA META-CROMATICA (ALZHEIMER)	1910	SULFATIDOSIS
WILSON	1912	DEGEN. HEPATO-LENTICULAR
NIEMANN-PICK	1914	ESFINGOMIELINOSIS
KRABE	1916	GALACTOCEREBROCIDOSIS
HUNTER	1917	MUCOPOLISACARIDOSIS
HURLER	1920	MUCOPOLISACARIDOSIS
HALLERVORDEN-SPATZ	1922	DEGENERACION PIGMENTARIA
REFSUM	1946	H. ATAX. POLINEURITIFORME.
STEELE-RICHARDSON-OLDZEWSKI	1964	PARALISIS SUPRANUCLEAR PROGRESIVA

Las diferentes entidades nosológicas fueron identificadas gracias a la invaluable tenacidad de los grandes clínicos y neuropatólogos. Al mismo tiempo se hacían los primeros árboles genealógicos que permitieron conocer el modo de transmisión de las enfermedades. Hacer una historia de esos 100 años correspondería a escribir la historia de la Neurología, lo que sale del ámbito de este trabajo.

Creemos importante para el lector neurólogo, hacer un breve recuerdo de la evolución de la genética durante esos años. Quien desee ampliarlo puede consultar los excelentes tratados de ROSEMBERG (1986), de WATSON *et al.* (1987), de EMERY (1986) y de DARNELL *et al.* (1986).

La historia de la genética comienza con los famosos estudios de Gregor MENDEL, el brillante monje Agustino, quien publicó en 1865 el resultado de sus trabajos con arberjas. Como es sabido, MENDEL postuló y demostró la existencia de unidades genéticas que residen en las células y en los gametos y son las responsables de la transmisión de los caracteres hereditarios. Desgraciadamente, su contribución, muy en avance para su época, pasó desapercibida y recién fué redescubierta hacia comienzos del siglo, gracias a los trabajos de BATESON en Gran Bretaña, de CORRENS, en Alemania, de VON TSCHERMAK en Austria y de VRIES en Holanda (ROSEMBERG, 1986). MENDEL estableció tres leyes de la herencia, que constituyen hasta la actualidad el soporte de la genética.

La primera ley establece el resultado del cruce de dos organismos, cada uno de los cuales es homocigote. Es decir, posee el mismo alelo en sus dos cromosomas homólogos (Fig. 1).

FIGURA 1

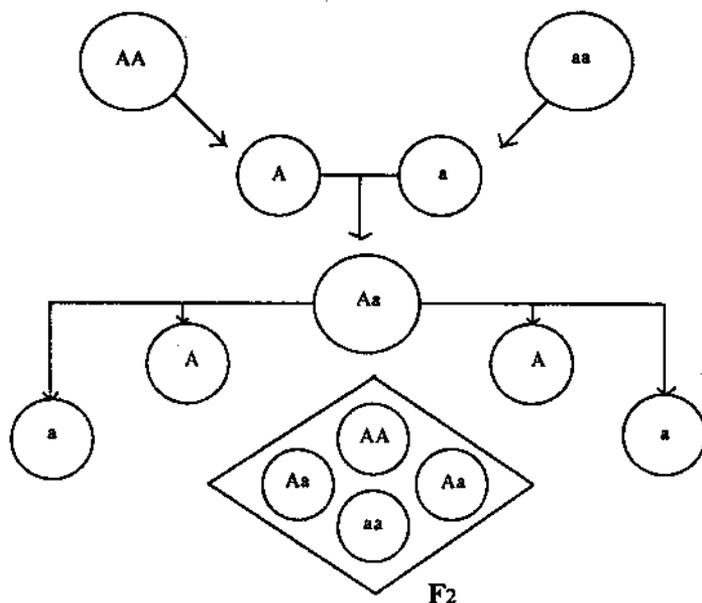


Fig. 1: Representación esquemática de las leyes de Mendel. La segunda generación F2 está representada por individuos que fenotípicamente son A en una proporción de 3/1.

Se llama alelo a un gen que existe en diferentes formas en el mismo locus o lugar del cromosoma. El alelo es diferente en los dos individuos. Cuando estos organismos se cruzan, sus productos son fenotípicamente iguales, aunque cada uno de ellos ya no sea homocigoto sino heterocigoto. Si, por ejemplo, un alelo se llama 'A' y el otro 'a', y uno de los padres es 'AA', mientras que el otro es 'aa' (cada uno de ellos es homocigoto), al cruzarse, cada uno de los hijos será 'Aa' (heterocigoto), pero su aspecto físico (fenotipo) será el que corresponde al alelo A, que se dice es el dominante. Si por ejemplo 'A' codifica para el color negro de los ojos y 'a' para el azul, los descendientes de la primera generación tendrán los ojos negros, aunque todos posean ambos alelos.

La segunda ley precisa lo que ocurre cuando se cruzan los individuos heterocigotos obtenidos por la primera combinación señalada en el acápite anterior (fig. 1). El cruce de los heterocigotos de la primera generación origina una proporción de productos tal, que un cuarto de los individuos de la segunda generación son homocigotos para cada uno de los alelos originales (de los "abuelos") y la mitad es heterocigoto. En otras palabras, al cruzar a los individuos 'Aa'-'Aa' se obtiene: 25% de 'AA', 25% de 'aa' y 50% de 'Aa'. Desde el punto de vista fenotípico, 75% de los productos tendrán los ojos negros y sólo 25% azules, pues 'A' es dominante.

Con la tercera ley, MENDEL explicó lo que pasa cuando se cruza dos individuos que difieren por más de un par de genes (por ejemplo 'AA-aa' y 'BB-bb'), lo que ocurre en la realidad, pues todos diferimos por muchos alelos. En este caso, cada par individual de genes se combina (segrega) de manera independiente, siempre que no exista una relación

(*linkage*) entre ellos. El par 'AA-aa' se combinará (segregará) de manera independiente al par 'BB-bb'.

SUTTON (1903), señaló que los cromosomas representan la base física de la herencia y JOHANNSEN en 1909, introdujo el vocablo gen, que tanta fortuna ha tenido para designar a las unidades mendelianas de la herencia. Los estudios de MORGAN y su equipo en Columbia, determinaron que los genes estaban distribuidos linealmente en los cromosomas. MORGAN también es pionero en el estudio de las relaciones (*linkage*) entre los rasgos, que han permitido localizar los locus de numerosos genes. La *relación* estudia la frecuencia con que dos genes se segregan juntos durante la recombinación meiótica. Como es sabido, durante la división meiótica de los gametos, se reduce el número de cromosomas a la mitad y se produce un intercambio de genes (en general, de fragmentos de ADN) entre dos cromosomas homólogos. En cada par cromosómico, cada uno de los cromosomas proviene de uno de los padres y se los llama homólogos. Cuando dos genes están próximos en el mismo cromosoma y se produce un intercambio de uno de ellos, casi siempre el gen próximo lo acompaña a su nueva localización (Fig. 2), por lo que se dice que están relacionados. La relación se mide en centimorgans (CM), un CM corresponde a una separación de 1000 kilobases (una kilobase corresponde a 1000 bases). Cuando dos genes están muy relacionados (segregan juntos), se puede determinar la presencia de uno de los genes si podemos reconocer al vecino, lo que se puede hacer si se conoce su fenotipo. Por ejemplo, si el gen X es el causante de una enfermedad y el gen Y es el responsable de la presencia de ojos de color rojo. Si X e Y están relacionados estrechamente (se hallan sobre el mismo cromosoma a una distancia de 1 CM) se puede afirmar que los individuos de una familia portadora de la enfermedad se hallan en grave riesgo de ser portadores del gen anormal X, si nacen con los ojos rojos.

FIGURA 2

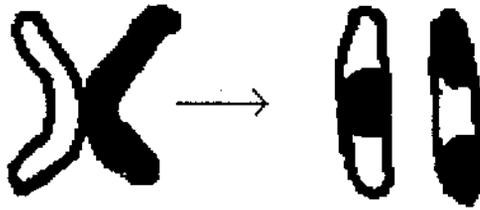


Fig. 2: Durante la meiosis se produce un intercambio de material entre cromosomas homólogos. Dos genes muy cercanos se desplazan juntos.

Durante la Segunda Guerra Mundial se realizó estudios capitales para el desarrollo de la genética. Así, en 1941, BEADLE & TATUM postularon que los genes controlan la síntesis de las proteínas, con el famoso aforismo: un gen-una enzima. Los trabajos de LENNEBERG en la *Escherichia coli*, permitieron desarrollar a este microorganismo como uno de los más útiles e importantes en genética molecular. El inicio de ésta es difícil de fijar, pero su desarrollo en los últimos 30 años ha sido asombroso.

#### EL PASADO INMEDIATO: LA GENÉTICA MOLECULAR

El pasado inmediato está marcado desde el punto de vista neurológico por el desarrollo de la neuroquímica, que precisó el tipo de error del metabolismo en un gran

número de enfermedades genéticas, fundamentalmente las recesivas autosómicas (TABLA II).

La genética molecular puede remontarse a cuatro descubrimientos capitales: 1) La demostración por AVERY, MACLEOD & McCARTY, en 1944, que el ADN es la molécula responsable de la herencia; 2) La descripción por WATSON & CRICK, en 1953, de la estructura del ADN; 3) El estudio de la regulación genética por JACOB & MONOD en 1961; y 4) El desciframiento del código genético por NIREMBERG entre 1961 y 1966; así como la prueba que el ARN lleva la información genética del ADN al sistema sintetizador de proteínas en los ribosomas.

**TABLA II**  
**ENFERMEDADES NEUROGENÉTICAS:**  
**LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA Y ANORMALIDAD.**

**ENFERMEDADES AUTOSÓMICAS DOMINANTES**

ENFERMEDAD	CROMOSOMA	DEFECTO
HUNTINGTON	4 p16	desconocido
STEINERT	19 a.	desconocido
ALZHEIMER FAMILIAR	21 q21	desconocido
POLINEUROPATIA AMILOIDÓTICA FAMILIAR	18 q11-12	transtiretin
E. MANIACO DEPRESIVA	11 p; X p	desconocido
ATROFIA ESPINOCEREBELOSA	6	desconocido
NEUROFIBROMATOSIS I	17	desconocido
NEUROFIBROMATOSIS II	22	desconocido
CHARCOT-MARIE (I)	1 q2	desconocido
ESQUIZOFRENIA	5 ?	desconocido
FRIEDREICH	9	desconocido

**ENFERMEDADES AUTOSÓMICAS RECESIVAS**

ENFERMEDAD	CROMOSOMA	DEFECTO
GAUCHER	1 q21	glucocerebrosidasa
GANGLIOSIDOSIS		
GM1	3 p1B	galactosidasa
GM2		
TAY-SACHS	15 q22-25	hexosaminidasa: $\alpha$
SANDHOFF	5 q13	hexosaminidasa: B
WILSON	13 q14	
POMPE	17 q	
LEUCODISTROFIA		
METACROMÁTICA	22 q	

**ENFERMEDADES LIGADAS AL CROMOSOMA X**

ENFERMEDAD	CROMOSOMA	DEFECTO
DUCHENNE	X p21	Distrofina
ADRENOLEUCODISTROFIA	X q27-28	
LESH-NYHAM	X q27 Defic.	HPRT
PELIZAEUS-MERZBACHER	X q21-22	Defic. prot. mielina

Vino luego el descubrimiento de la transcriptasa reversa por TEMIN & BALTIMORE en 1970, y el abordaje del estudio genético de las células eucariotas. En 1972, Paul BERG creó, por primera vez, una molécula de ADN recombinante al insertar parte del genoma de un virus en el ADN de otro virus. Un año después, COHEN & BOYER desarrollaron la técnica para asociar un gen humano con un plásmido, y abrieron el camino para la aplicación de la ingeniería genética al hombre. En los últimos años de la década del 70, se describieron técnicas capitales para el desarrollo de la genética inversa: el "Southern blot" (1975), los métodos para secuenciar el ADN (SANGER, 1977; y MAXAM & GILBERT, 1977), la creación de librerías de genes humanos y la técnica de los fragmentos de restricción de talla polimórficos (usados por primera vez por KAHN & DOZY en 1978). Algunas de éstas técnicas han sido mejoradas y perfeccionadas durante los años 80. Así, se introdujeron los métodos llamados megabase (la electroforesis en campo pulsado, la creación de cromosomas artificiales en la levadura, las librerías del salto), con los que se logra una exploración cromosómica más rápida que con los métodos clásicos, introducidos en la segunda mitad de los años 70 (JORDAN, 1988).

En los últimos años, se ha comenzado a usar éstas y otras técnicas para lograr un análisis del ADN cada vez más preciso y rápido (LANDEGREN *et al.*, 1988). No podemos mencionar todas las técnicas que se han desarrollado recientemente, pero sí deseamos puntualizar que actualmente es posible provocar una mutación que comprometa un sólo nucleótido, sea en especímenes fijos con el sondeo por oligonucleótidos alélicos específicos, sea en especímenes en solución con el sondeo por el ensayo de ligazón de oligonucleótidos. No es posible referirse a los métodos recientemente creados sin hablar de la llamada reacción en cadena por la polimerasa (PCR). Consiste en la amplificación de la muestra de ADN que se quiere analizar, de tal manera que se pueda estudiar una muestra muy pequeña del ADN de un paciente. La automatización de estos métodos está en desarrollo, por lo que el estudio de los ácidos nucleicos, con fines de investigación o clínicos, dejará pronto de ser artesanal.

Los estudios realizados durante los últimos 30 años han conducido a nociones bastante sólidas. Los cromosomas están hechos de una doble cadena de ADN enrollada en espiral, a la que se asocian proteínas como las histonas (que son proteínas estructurales), enzimas (como las polimerasas) y proteínas reguladoras de la función genética. Cada cadena de ADN está formada por nucleótidos asociados por una unión fosfo-glúcida. Un nucleótido es una molécula constituida por un fosfato, un azúcar, la desoxiribosa y una base. Existen cuatro bases en el ADN; dos pirimidínicas: la timida y la citosina; y dos purínicas: la adenina y la guanina. Los nucleótidos están unidos entre sí por uniones entre el fosfato y la desoxiribosa. La doble cadena de ADN está enrollada de tal manera que las bases miran hacia adentro, apareándose por afinidad (guanina con citosina y timina con adenina), mientras que la región fosfodiéster forma la periferie de la molécula y está en contacto con el agua. Sobre esta inmensa doble cadena se suceden los genes de manera lineal pero no continúa, pues entre gen y gen existe muchas veces un gran trecho de ADN no codificante (la secuencia intergénica). Un gen está siempre situado sobre una de las cadenas. Es la sucesión de bases la que contiene el código genético. En efecto, tres bases seguidas constituye un codón, el que especifica qué aminoácido debe ir en la posición correspondiente dentro de la proteína. Un gen está constituido por aquella porción de ADN

que codifica para un polipéptido, por lo tanto, contiene numerosos codones que se suceden linealmente. Cada codón indica cuál es el aminoácido que debe ocupar una determinada posición en el momento de construir la proteína. En el ADN, se acepta en la actualidad, existen genes, secuencias reguladoras y porciones intergénicas no codificantes, cuya función se desconoce hasta el momento. Dentro de un gen de una célula eucariota se encuentran porciones que codifican para la proteína y porciones que no codifican para ella. Las primeras se llaman exones y las segundas intrones. Por lo general, los intrones se encuentran entre los exones, separándolos. Al lado del gen se encuentra el promotor, que permite la fijación de la ARN polimerasa. Esta es una enzima que realiza la transcripción, es decir la síntesis de ARN. El ARN es la copia complementaria del ADN y es el que lleva la información fuera del núcleo. Se dice que el ARN es la copia complementaria del ADN porque la cadena de ADN se copia de tal manera que ahí donde el nucleótido de ADN posee como base una adenina, el ARN tiene un uracilo, y ahí donde la cadena de ADN tiene una citosina, la ARN polimerasa pone una guanina y viceversa. Por ello se dice que la citosina y la guanina son complementarias y que la adenina es complementaria de la timidina (que sólo existe en el ADN) y del uracilo (que reemplaza a la timidina en el ARN). A distancia del promotor y del gen muchas veces existe un *enhancer*, que es una porción de ADN que tiene una acción estimuladora de la transcripción pero sobre un gen que puede estar situado lejos e incluso por delante del *enhancer*. Las secuencias *enhancer* parecen tener una función esencial en el control de la expresión de los genes en el curso del desarrollo, de la diferenciación y de los procesos de regulación hormonal (KAHN, 1987).

El gen es transcrito, según el caso, en varios tipos de ARN, por la polimerasa correspondiente (ARN mensajero, ARN de transferencia y ARN ribosómico). Sólo nos referiremos al ARN mensajero. El primer transcrito se llama ARN heterónimo nuclear o pre-ARNm; es exclusivamente intranuclear y debe sufrir una serie de modificaciones antes de estar apto para salir del núcleo y dirigir, en el citoplasma, la síntesis proteica o traducción. Las modificaciones que se producen consisten fundamentalmente en:

- 1) Agregarle un capuchón en la región inicial del ARN, que consiste en un nucleótido de guanina que se une a la porción 5' del mensajero.
- 2) La inserción de una cola de poli-A, que consiste en la sucesión de numerosos residuos de adenina, en la región terminal del mensajero o porción 3'.
- 3) El empalme, que consiste en retirar del mensajero los intrones y unir cabo a cabo los exones en el orden adecuado.

Una vez ocurridos estos fenómenos modificatorios, el ARN mensajero puede salir del núcleo, dirigirse hacia los ribosomas, y ahí, con la ayuda del ARN de transferencia y de factores especiales, dirigir la síntesis del polipéptido correspondiente. Este último mecanismo se conoce con el nombre de traducción.

La demostración de la complejidad del ADN ha llevado a redefinir con más exactitud el concepto de gen. Actualmente se prefiere reservar este término para designar a las secuencias de ADN que contienen el código de posición de los aminoácidos dentro de un polipéptido (así como para su inicio y terminación) o que codifican para cadenas funcionales de ARN. Todas las regiones reguladoras de la transcripción son consideradas como extragénicas (WATSON *et al.*, 1987).

### *Los fragmentos de restricción de talla polimórficos*

Antes de describir el estado presente de la genética molecular es necesario explicar lo que se denomina fragmento de restricción de talla polimórfico (RFLP). El ADN difiere entre los individuos tanto a nivel de los genes, que constituyen la base de su individualidad, como a nivel de las secuencias intergénicas. Estas diferencias de secuencia son más frecuentes a nivel de las regiones no codificantes y de las no reguladoras (como las secuencias intergénicas), en que las mutaciones pueden acumularse sin graves consecuencias. Las enzimas de restricción son proteínas que cortan el ADN a nivel de secuencias específicas. Cuando la misma región de dos cromosomas homólogos es sometida a la acción de la misma enzima de restricción, por ejemplo la EcoRI, la enzima cortará el ADN en los mismos lugares y los fragmentos que se obtendrán serán de igual talla. Si por el contrario, hay pequeñas diferencias entre ambos cromosomas, el corte no se producirá exactamente en el mismo lugar. En efecto, una mutación habrá hecho desaparecer un sitio de clivaje, y por lo tanto, los fragmentos no serán de la misma talla en uno y otro cromosoma (Fig. 3). Si se posee una sonda radioactiva que reconozca el segmento en estudio, se puede reconocer si los dos cromosomas son iguales o difieren. Una sonda radioactiva es una cadena complementaria de ARN o de ADN marcado con un ión radioactivo (P,<sup>32</sup>H,<sup>3</sup>H, etc.). Como la sonda es complementaria a la secuencia cuyo tamaño se quiere estudiar, cuando se la junte con el fragmento en estudio, se le unirá (se dice que hibridizará con él). Para estudiar la talla de los fragmentos de ADN, se hace una electroforesis en agar de los segmentos digeridos por la enzima de restricción. De acuerdo a su talla, los fragmentos emigrarán a una determinada distancia (los fragmentos más pequeños migran más lejos). Al poner en contacto el agar, en el que se ha hecho migrar los fragmentos de un cromosoma con la sonda, ésta se unirá a su cadena complementaria. Una película de fotografía puesta sobre el agar localizará al fragmento "reconocido" por la sonda, pues impresionará la película fotográfica. Así se podrá ver cuál es el tamaño del fragmento (es el método de Southern blot). Si existe una mutación, al hacer lo mismo con el cromosoma homólogo, la sonda reconocerá un fragmento de otro tamaño.

Ahora bien, si por ejemplo (Fig. 3) descubrimos que en una familia determinada el alelo A, normal, está asociado con un fragmento de 7 kb, mientras que el alelo B, anormal, está asociado con un fragmento de 9 kb y que esta asociación se debe a una mutación cercana al locus del gen (es decir que el gen y el polimorfismo están relacionados *-linked-*) se puede decir que en la familia en cuestión, cada vez que un individuo tenga un fragmento de 9 kb será un portador del gen. De esta manera, se posee un poderoso medio de diagnóstico prenatal, y además, una primera aproximación al gen anormal, el que puede ser localizado por la búsqueda de locus polimórficos cada vez más cercanos ("se camina sobre el gen"), hasta que nos hallemos en el gen mismo. Este procedimiento, que está en la base de la genética inversa, era tedioso y lento hasta hace unos pocos años, sin embargo, últimamente se han descrito métodos que permiten avanzar en el cromosoma de manera mucho más rápida. Son las llamadas técnicas megabase, que permiten progresar en el cromosoma a una escala de 1000 kilobases, contra las 20 ó 30 kb que permitían las técnicas usadas hasta hace tres o cuatro años.

FIGURA 3

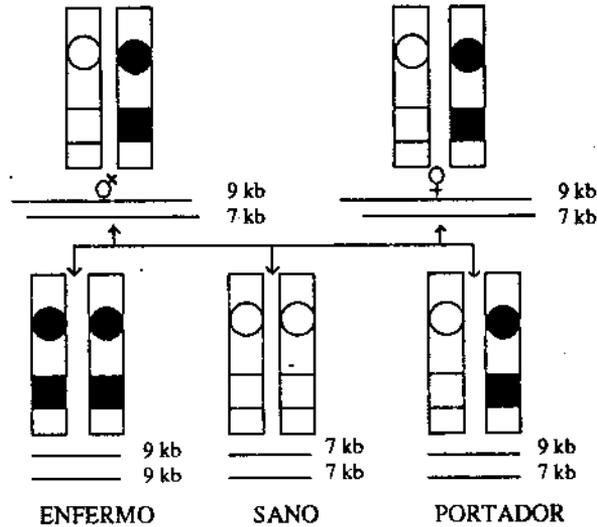


Fig. 3: Ejemplo del uso del polimorfismo de restricción de talla y del Southern blot para detectar heterocigotos portadores del gen anormal. Rectángulo negro: gen anormal; rectángulo blanco: gen normal; circunferencia negra: alelo polimorfo que da, al ser digerido por una enzima de restricción, un fragmento de 9 Kb y se halla siempre asociado al gen anormal; circunferencia blanca: alelo polimorfo que da, al ser digerido por una enzima de restricción, un fragmento de 7 Kb y se halla siempre asociado al gen normal. Al digerir el fragmento del cromosoma portador de estas secuencias, cada vez que el Southern blot compruebe la presencia de un fragmento de 9 Kb estaremos frente a un portador del gen anormal. Si el fragmento de 9 Kb se asocia con un fragmento de 7 kb el sujeto es un portador de la enfermedad (heterocigoto); si sólo se encuentra un fragmento de 9 Kb el paciente es un homocigoto para el gen anormal y es enfermo; si sólo se demuestra un fragmento de 7 kb el sujeto está idemne.

Las enzimas de restricción, el Southern blot, el clonaje y el secuenciamiento del ADN han permitido el gran desarrollo de la genética molecular actual. Sin embargo, todavía se presentan dificultades técnicas, sobretudo cuantitativas, para la difusión del uso de la ingeniería genética en medicina. El análisis de una mutación muy pequeña (puntiforme) es un trabajo gigantesco; otras veces el material de ADN del que dispone es muy pequeño como para poder clonar. Recientemente se ha descrito una técnica que permite superar estas dificultades: se trata del método de amplificación de fragmentos de ADN (o en una variante de ARN) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Descrita por SAIKI *et al.* en 1985, la PCR permite multiplicar *in vivo*, un número considerable de veces, cualquier fragmento de ADN, aunque la técnica rinde mejor en los fragmentos del tamaño reducido (algunas centenas de bases). Este método ya ha encontrado una amplia aplicación en el diagnóstico pre y postnatal de una mutación genética, en la detección de secuencias virales y en medicina legal (KAHN, 1988). No cabe ninguna duda que su utilidad irá creciendo a medida que se desarrolle más la genética molecular.

Antes de entrar a la descripción del presente, es decir la aplicación que se da a todas estas técnicas, es interesante recordar los diferentes tipos de mutación que se puede encontrar.

### *Las Mutaciones*

Una mutación es un cambio en la secuencia del ADN. Existen varios tipos, que pueden resumirse en dos clases: mutaciones puntiformes, en las que cambia un sólo nucleótido, y mutaciones en las que el cambio abarca todo un segmento del ADN (varios nucleótidos).

Las *mutaciones puntiformes* pueden ser de varios tipos: *mutaciones silenciosas*, en las que el cambio afecta a una base pero sin alterar el código de lectura por lo que la proteína contiene los mismos aminoácidos; *mutaciones de sentido*, en las que el cambio de nucleótido conduce a la transformación del código, por lo que el polipéptido es sintetizado con un aminoácido diferente o se produce una modificación en la secuencia reguladora (promotor o *enhancer*); *mutaciones sin sentido*, en las que el cambio de la base en la secuencia del ADN, conduce a la aparición de un codón de fin de síntesis, por lo que se produce una proteína anormalmente corta, no funcional; *mutaciones con cambio de encuadre*, debidas a la inserción de un nucleótido más o a la microdelección de un nucleótido, lo que introduce un nuevo código después de la mutación, pues la lectura del código se desfasa.

Las *mutaciones de segmentos de ADN* son fundamentalmente de dos tipos: *deleciones* de todo un gen o de una parte del gen por pérdida de un fragmento de ADN, que puede ser de tres nucleótidos o múltiplo de tres, en cuyo caso se produce una proteína anormal a la que le faltan algunos aminoácidos; o que puede ser de un fragmento no múltiplo de tres, en cuyo caso se produce un decalaje en la lectura del código, y se modifica totalmente la proteína. *Inserciones*, en las que un fragmento de ADN se inserta dentro del gen y produce una alteración del código múltiplo de tres o no. El primero es algo menos grave que el segundo.

### *Frecuencia de las Mutaciones en el Hombre*

Las deleciones representan del 5 al 15% de las mutaciones conocidas en el ser humano. Las más conocidas de las mutaciones puntiformes son las mutaciones sin sentido.

### *EL PRESENTE*

El presente de la genética molecular está marcado por:

La genética inversa.

El diagnóstico prenatal y postnatal.

La selección de modelos animales.

La ingeniería genética.

La neurofisiología de proteínas neuronales, y el aislamiento de polipéptidos específicos.

### *La genética inversa*

En los últimos años se habla mucho de la genética inversa, que con sus resultados espectaculares en patología genética, está revolucionando la medicina en general y la

neurología en particular. En efecto, en esta última existe un gran número de enfermedades hereditarias, consideradas hasta hace muy poco como una inabordable curiosidad.

La genética inversa consiste, como lo dice su nombre, en invertir la metodología seguida hasta hace poco en patología genética. En el pasado se partía de la proteína defectuosa, cuyo conocimiento permitía, por vías más o menos largas, identificar el gen correspondiente. Tal es el camino que se siguió en las hemoglobinopatías, por ejemplo. Reconocido el gen se puede iniciar su análisis y el diagnóstico prenatal puede a veces ponerse en práctica. El tratamiento podría intentarse por la terapia sustitutoria, la que también ha resultado enormemente favorecida por las técnicas de ingeniería genética.

La genética inversa parte del estudio del ADN, sin que sea necesario conocer la proteína defectuosa ni el tejido en que se expresa. Lo importante en la nueva forma de exploración es el estudio genético del mayor número de constituyentes de una o varias familias afectadas por la enfermedad. El análisis consiste en encontrar en el ADN puntos de referencia que permitan aproximarse al gen. Estos puntos de referencia son los RFLP. En la actualidad se cuenta, en el hombre, con una carta genética de los RFLP y sus sondas correspondientes.

El análisis de las familias permite, en un primer tiempo, identificar el cromosoma en el que se encuentra el gen implicado en la enfermedad. Luego, su locus puede ser precisado, gracias al hallazgo de otros puntos de relación más cercanos y más conocidos. Eventualmente, una traslocación o una delección asociada con el fenotipo puede permitir la localización más rápida del gen.

Es importante precisar que este abordaje permite revelar la naturaleza del defecto molecular responsable del fenotipo patológico. En efecto, es posible identificar el transcrito del gen anormal y luego localizarlo en el tejido y en la célula correspondientes. Para ello, una vez identificado el gen, es necesario clonarlo y secuenciarlo (por lo menos parcialmente). Se llama clonaje al método por el que un gen se puede aislar y amplificar, para lo que el fragmento de ADN, que constituye el gen, se introduce dentro de una bacteria (*E. coli*) a la que se deja proliferar. Las bacterias hijas contienen cada una el gen en cuestión, que puede extraerse de la célula y luego secuenciarse. El conocimiento del gen puede llevar a producir artificialmente la proteína o parte de ella. Esta puede ser identificada por medio de la producción de anticuerpos monoclonales, lo que puede lograrse mediante la inyección a un ratón de la proteína (o de un fragmento de ella) producida artificialmente. Gracias al marcaje de los anticuerpos por histofluorescencia (u otro método) se puede localizar el polipéptido y luego estudiar su función. Otra manera de aislar la proteína cuya alteración es la responsable de la enfermedad es mediante la identificación de su mensajero. Para ello se aíslan los ARNm de una región (los ganglios basales por ejemplo). Cada uno de ellos dirigirá la síntesis de una proteína cuando sea puesto en un sistema de traducción celular libre. La proteína puede ser identificada si se tiene idea de parte de su secuencia por medio de una reacción inmunológica. Por otro lado, el ARNm puede servir para producir su ADN por una transcriptasa reversa, el que puede ser clonado y luego secuenciado.

No todo es exitoso en la genética inversa, pues en algunas enfermedades, como la del cromosoma X frágil, hace varios años que equipos muy competentes dan vueltas en redondo sin avanzar ni un ápice. Esto, a pesar que se conoce ya desde hace un tiempo la probable

localización del gen en el segmento q27-q28 del cromosoma. Es muy posible que sea necesario esperar el desarrollo de técnicas que permitan detectar una expresión diferencial (de un tejido al otro o del sano al enfermo) de genes contenidos en grandes segmentos de ADN clonado en levaduras.

Gracias a estas técnicas se conocen en la actualidad los locus de numerosas enfermedades hereditarias (TABLA II) y se dispone de medios de diagnóstico prenatal o en el supuesto portador.

### *Los métodos de diagnóstico prenatal*

La enfermedad puede diagnosticarse en el portador *in útero* (con el fin de practicar el aborto), o en el adulto si así lo desca. El análisis se puede hacer en las células amnióticas durante el segundo trimestre del embarazo o en el tejido coriónico durante el primer trimestre. En el adulto o en el niño sospechosos de ser portadores, la detección se hace en los reticulocitos.

Existen dos tipos de métodos: directos e indirectos. Los primeros estudian el defecto molecular, es decir, ponen en evidencia la alteración genética misma. Los segundos se basan en el *linkage* de una secuencia de ADN conocida y para la que se posee una sonda. En ambos casos, el ADN del cromosoma portador del gen se digiere por una enzima de restricción, que origina un polimorfismo en el Southern blot. Los miembros sanos de una familia tienen un determinado patrón de bandas en el examen, mientras que los portadores de la mutación anormal poseen otro patrón (Fig. 3).

En los métodos directos o bien existe una menor hibridización con un ADNc marcado o bien la mutación ha creado un cambio en el lugar de reconocimiento de una enzima de restricción; lo que crea dos fragmentos de talla diferentes según el sujeto sea normal o portador.

En los métodos indirectos se emplea también el polimorfismo de restricción, pero en este caso la sonda y la mutación responsable de la diferencia de talla de los fragmentos, en el Southern blot, no están sobre el gen sino muy próximas a él.

### *La genética comparada*

Un procedimiento en animales permite encontrar el modelo correspondiente a la enfermedad humana, lo que, por ejemplo, se ha logrado con la *distrofia muscular de Duchenne*.

En un futuro se podrán crear, gracias a la combinación de esta metodología con la transferencia de genes (animales transgénicos) y las mutagénesis, modelos artificiales de enfermedades genéticas.

### *Ejemplos específicos*

Es importante conocer la obra de la genética inversa. Para ello revisaremos brevemente algunas de las enfermedades en las que se ha conseguido los logros más espectaculares (MARTIN, 1987).

La *enfermedad de Duchenne* es, probablemente, la enfermedad neurológica que más satisfacciones ha dado a los usuarios de la genética inversa. En efecto, en pocos años (CHELLEY & KAPLAN, 1988), los equipos de WORTON y de KUNKEL han detectado el locus de la enfermedad en la banda p21 del cromosoma X. Se ha determinado que el gen es inmenso, mide unos 2000 kb de extensión, lo que explica la frecuencia de sus alteraciones y se ha detectado la proteína defectuosa, la distrofina. Esta es un componente de las triadas musculares y es probable que su alteración conduzca a un defecto estructural, responsable de una fuga de calcio y del daño de la fibra muscular por este ión. Sabemos también que la *enfermedad de Becker* se debe a una alteración del mismo gen. Su relativa benignidad se debería a la remoción de todo un exón, lo que lleva a la producción de una proteína parcialmente funcional. En la *enfermedad de Duchenne*, se produciría una delección de un número de bases que no es un múltiplo de tres, lo que altera la lectura del código de manera grave, con la consiguiente ausencia de proteína. Esta hipótesis no ha recibido confirmación. En el ratón se ha puesto en evidencia la existencia de una enfermedad debida a la alteración del mismo gen (ratón mdx), pero que por razones todavía desconocidas, no es tan grave como el *Duchenne*.

El considerable tamaño del gen explica la frecuencia de la aparición de nuevos casos debidos a mutaciones en los gametos paternos o en el mismo embrión. La mutación más frecuente es una delección, que sería responsable de la mitad de los casos.

La *enfermedad de Huntington*. Los magistrales trabajos de GUSSELLA *et al.* han podido localizar el gen de esta enfermedad en el brazo corto del cromosoma 4 (4p15 ó 16). Recientemente, GILLIAM *et al.* (1987) han hallado una sonda ligada más estrechamente al gen.

Un hallazgo muy interesante, que concierne al mecanismo de la enfermedad, se ha hecho en una familia venezolana. En ella se ha demostrado que los homocigotos y los heterocigotos tienen manifestaciones clínicas idénticas lo que conduce a pensar que la enfermedad se halla asociada con mutaciones que producen una ganancia de función; es decir, que la mutación podría ejercer sus efectos nocivos al expresar en exceso una función celular normal.

La *enfermedad de Alzheimer*, cuyo gen de la forma familiar representa un 10% de los casos, ha sido localizado en el cromosoma 21. Se transmite de manera autosómica dominante. Los estudios que condujeron a buscar una asociación entre el cromosoma 21 y el *Alzheimer* familiar fueron: 1) la *enfermedad de Down*, cuando se prolonga más allá de los 40 años, se acompaña de placas seniles y de imágenes de degeneración neurofibrilar, algunos de estos casos se acompañan de demencia. 2) En las placas seniles se encuentran fibrillas amiloides, de las que se ha aislado una proteína llamada A4 ó B amiloide. Existe, por otro lado, evidencia que la proteína A4 es uno de los componentes de los filamentos helicoidales de la degeneración neurofibrilar. El gen de la proteína amiloide (A4 ó B proteína) reside en el cromosoma 21, a nivel de las bandas q21-22. Produce por lo menos tres ARNm, a los que se denomina: APP<sub>695</sub>, APP<sub>751</sub>, y APP<sub>770</sub>. APP<sub>695</sub>, que fué el primero en ser identificado, codifica para una proteína (precursora de la proteína amiloide o APP) de

695 aminoácidos de largo, que incluye A4 en la posición 597 á 638. APP<sub>751</sub> es idéntica a la anterior, salvo por un agregado de 168 nucleótidos, que introduce, en su producto protéico, un complejo de 56 aminoácidos a partir de la posición 288. Se lo ha llamado HL124i y tiene una actividad inhibitora de las proteasas. Este producto, por lo tanto, podría tener una función importante en la formación del amiloide, sea porque inhibe la degradación de A4 y permite su acúmulo; sea porque impide su acúmulo al inhibir las proteasas responsables de su formación. Se ha hecho varios trabajos para tratar de conocer el mecanismo de la formación de amiloide en la *enfermedad de Alzheimer*. PALMERT *et al.* (1988), han encontrado que el aumento del ARNm de la proteína APP se encuentra fundamentalmente en el *núcleo basal de Meynert* y el *locus coeruleus*. Este aumento ocurre casi exclusivamente a expensas del APP<sub>695</sub>, es decir, del ARNm que codifica para la APP separada del fragmento inhibitor de las proteasas, la que se vería atacada y degradada por estas enzimas, produciéndose grandes cantidades de A4. Como no se ha encontrado un aumento correlativo del ARNm en otras partes del sistema nervioso central, los autores piensan que las placas seniles serían producidas a partir de la proteína A4 que llega a la corteza por los axones del *núcleo de Meynert* y del *locus coeruleus*.

Durante un tiempo se pensó que el gen de la *enfermedad de Alzheimer* y el de la proteína amiloide coincidían. En la actualidad existen suficientes argumentos como para afirmar que se trata de dos genes diferentes. El gen de la forma familiar de la *enfermedad de Alzheimer* se halla a unos 10 cM más próximo del centrómero que el de la proteína amiloide (DREYFUS, 1987).

Muy recientemente, este hermoso edificio ha comenzado a remererse. En efecto, SCHELLENBERG *et al.* (1988), no han podido encontrar ninguna relación entre el cromosoma 21 y la *enfermedad de Alzheimer*. Este hallazgo es embarazoso, pues, si bien una parte de los enfermos del grupo de SCHELLENBERG difiere de los enfermos estudiados por St. GEORGE-HYSLOP y GUSELLA ( los investigadores que encontraron una asociación entre el *Alzheimer* y el cromosoma 21), otra parte de los enfermos no difiere en los dos grupos. En efecto, los enfermos en 6 de las 15 familias estudiadas por SCHELLENBERG *et al.* comenzaron tardíamente la enfermedad, pero en las 9 familias restantes el inicio fué temprano y comparable al del grupo de Harvard. Este nuevo trabajo obliga a considerar la posibilidad que la *enfermedad de Alzheimer* sea heterogénea desde el punto de vista genético.

La *polineuropatía amiloidótica familiar* se debe al depósito de fibrillas de sustancia amiloide en los nervios periféricos, riñones y corazón. La alteración es autosómica dominante y ataca fundamentalmente el sistema nervioso vegetativo. Clínicamente se caracteriza por hipotensión ortostática, anhidrosis, impotencia y alteraciones gastrointestinales; la sintomatología comienza en la tercera década. Se debe a una mutación en el gen que codifica para la transtiretín, proteína portadora de la tirocina y vitamina A, y que se halla en el cromosoma 18. La mutación es puntiforme y compromete un solo par de bases. En las familias japonesas, portuguesas y suecas hay una sustitución de metionina por valina en la posición 30. En una familia judía se ha encontrado otra sustitución: glicina por treonina en posición 49. Se desconoce la razón por la que la enfermedad comienza tardíamente.

La *neurofibromatosis* incluye dos fenotipos: la forma clásica, asociada fundamentalmente a tumores periféricos; y la forma central en la que predomina los tumores del nervio acústico, asociados a meningiomas, gliomas y schwannomas. En la primera, llamada neurofibromatosis 1, el gen responsable se halla en el cromosoma 17, cerca del gen del factor de crecimiento neuronal. En la segunda (la neurofibromatosis 2), el gen está en el cromosoma 22 (WERTELECKI *et al.*, 1988).

La *psicosis maníaco-depresiva* incluye dos asociaciones genéticas con su fenotipo. En unas familias la mutación se halla en el brazo corto del cromosoma 11. En otras, el gen responsable de la enfermedad estaría en el cromosoma X.

La *esquizofrenia* ha provocado enorme interés en la comunidad médica y psicológica por la publicación en noviembre de 1988 de un trabajo que la relaciona con una mutación a nivel de un gen situado en el cromosoma 5. La enfermedad parecería (GURLING, 1988) ligada a un defecto monogénico y no poligénico como muchos pensaron. Este trabajo debe ser visto con reservas, pues en el mismo número de la revista aparece otra publicación en la que se señala que no se ha podido encontrar la misma relación en otra familia.

Algunos *tumores cerebrales* se deben a deleciones cromosómicas; en el cromosoma 13 en el caso del retinoblastoma, y en el 22 en el caso de neurinomas bilaterales del acústico y algunos meningiomas.

El gen cuya deleción provoca un retinoblastoma (gen Rb) codifica para una proteína antioncogénica, la proteína p 110-114. Esta proteína inactiva algunos oncogenes, sea al actuar a nivel del oncogen o al inactivar su producto. Una alteración del antioncogen Rb parece también responsable del cáncer del seno, del cáncer a pequeñas células del pulmón y del osteosarcoma.

### *La ingeniería genética*

Las técnicas de recombinación del ADN se utilizan con gran éxito para producir proteínas naturales que pueden ser usadas para la terapia sustitutiva, o para actuar sobre la coagulación u otra función fisiológica. Es el caso del activador tisular del plasminógeno, que es el más potente de los agentes fibrinolíticos. En general la ingeniería genética puede ser usada para producir cualquier polipéptido de interés biológico, como el interferón, vacunas, interleukinas, factores de crecimiento y sustancias neuroactivas.

El principio consiste en introducir un gen humano clonado y más o menos modificado *in vitro*, en un célula en la cual pueda ser viable. En algunos casos el gen puede ser artificial, sintetizado en el laboratorio. De esta manera se puede obtener grandes cantidades de producto codificado por el gen a un menor costo que a través de los procedimientos clásicos.

En muchos casos, la proteína activa es un producto derivado de un precursor, que requiere haber sufrido una serie de cambios post-traduccionales, como la glicosilación, la carboxilación y la eliminación de fragmentos por corte proteolítico. Sólo las células eucariotas pueden hacer tales modificaciones, por lo que el gen tiene necesariamente que ser expresado en ellas. Incluso, en algunos casos, la célula productora tiene que ser una célula animal (factores de la coagulación, por ejemplo).

En la actualidad, la ingeniería genética se usa para producir:

1) Productos de diagnóstico, como sondas para el diagnóstico prenatal o para la hibridación *in situ*, que pueden servir para diagnosticar infecciones virales (encefalitis herpética, por ejemplo).

2) Vacunas: Se ha propuesto que el virus de la vacuna, de tan fácil aplicación, puede modificarse de tal manera que sea portador de una proteína antigénica de otro virus o de un parásito (malaria por ejemplo).

3) Productos terapéuticos de sustitución (factores de la coagulación, por ejemplo), proteolíticos, interferón, factores de crecimiento, neurotransmisores y neuromoduladores.

### *Procedimientos genéticos en neurofisiología*

Mediante la manipulación genética (mutaciones dirigidas) puede determinarse la función de muchas proteínas celulares y analizar cada uno de sus dominios. En efecto, se puede provocar una mutación puntiforme en uno de los exones del gen que codifica para un receptor, por ejemplo. De esta manera se modifica la secuencia de un dominio proteico. El estudio de la actividad de la proteína modificada, en una célula como el oocito del *xenopus*, por ejemplo, permite conocer la función del dominio (dominio ligante, dominio que interactúa con la proteína G, etc).

Recientemente, PALMITER *et al.* (1987) han ideado un método para destruir células selectivamente. Para ello producen un animal transgénico, en el que el ADN que codifica para una proteína tóxica (la toxina diftérica, por ejemplo), se pone bajo el control de secuencias reguladoras que sólo estimulan la transcripción en determinadas células. Este transgen se introduce en una de las células germinales de un animal. El animal transgénico sólo producirá la proteína tóxica en determinadas células, las que serán destruidas. Así se puede provocar la destrucción selectiva de neuronas, y obtener un excelente modelo experimental.

Las técnicas de genética molecular pueden también usarse para sintetizar o identificar neuropéptidos. Para ello se utilizan dos procedimientos:

1) En el primero se aísla el ARNm de una región que produce el neuropéptido deseado. Las diferentes moléculas de ARN se separan por electroforesis y luego se les permite producir su proteína en un sistema libre de traducción. La proteína deseada se identifica por medio de anticuerpos monoclonales marcados. De esta manera se puede identificar el mensajero que dirige la síntesis de la proteína bajo investigación. Por medio de la transcriptasa inversa se sintetiza el ADNc, que se clona y se secuencía. El estudio de la secuencia permite conocer la estructura de la proteína.

2) Otra estrategia para identificar las proteínas específicas del sistema nervioso central, consiste en aislar genes que sólo se expresan en el cerebro. Esto se logra al identificar los ARNm exclusivamente presentes en el cerebro (una revisión muy reciente de MILNER & SUTCLIFFE en 1988, explica los métodos que pueden emplearse para ello). Identificados los ARNm, se crea librerías de ADNc, para ello se somete el ARNm a la acción de la transcriptasa inversa, que crea un ADNc (complementario al ARNm). El ADNc se clona en un vector apropiado, es decir se purifica y multiplica. Para ello existe diversas técnicas, pero todas respetan los siguientes pasos: a) Una vez producido el ADNc se crea

una segunda cadena de ADN para tener una población de doble cadena. b) Introducción de la doble cadena de ADN en un vector, habitualmente un plásmido o un bacteriófago. c) Transfección, con los vectores recombinantes, de células huésped que pueden ser bacterias o células eucariotas. El crecimiento de las células huésped permite obtener células que contienen el ADN de interés, a cuyo aislamiento puede procederse. La transcripción del ADN produce un ARNm, que introducido en un oocito expresa la proteína que codifica. Se calcula que el cerebro produce unas 30,000 proteínas específicas.

Los polipéptidos identificados pueden servir para múltiples pruebas farmacológicas bioquímicas o neurofisiológicas.

### EL FUTURO

De continuar así, la neurogenética molecular se convertirá en la más importante de las ciencias básicas neurológicas, sobre todo por sus posibles aplicaciones prácticas. Una vez más, se confirma la frase de BACON: "La ciencia y el poderío humano tienen una estrecha correspondencia y tienden al mismo fin".

A nuestro entender el futuro se centra alrededor de dos fenómenos: la transferencia de genes y el desarrollo de la ingeniería genética.

#### *La transferencia o la inserción de genes*

Existen varios modelos hipotéticos para ser usados en el tratamiento de las enfermedades genéticas (ANDERSON, 1984). Se ha usado, con relativo éxito, la implantación de un gen normal en una célula precursora, que luego es reintroducida en el organismo. Este método podría usarse en enfermedades en las que basta un aporte pequeño de la proteína normal para compensarla (por ejemplo, la hemofilia). En el caso de una enzimopatía, como la *enfermedad de Tay-Sachs*, sería necesario introducir el gen en todas las células que usan la enzima, lo que por el momento es una tarea muy difícil. Una posibilidad es la de usar partículas virales para introducir el gen. Para ello el feto se infectaría por la inyección intra-amniótica del virus modificado, de tal manera que haya perdido todas sus proteínas nocivas y contenga el gen normal. Esto no bastaría, pues sería necesario que el virus pueda reconocer específicamente las células que requieren del gen y que, por lo tanto, se excluya de la infección fetal las neuronas o las células gliales en las que el gen no es activo en condiciones normales. Para ello se puede emplear un retrovirus (que puede insertar en el cromosoma el material genético trasplantado) y en el que se haya introducido proteínas que le permitan reconocer determinadas células e introducirse en ellas. Por ejemplo, si se quiere introducir un gen en los oligodendrocitos, el virus portador del gen debe de poseer en su membrana polipéptidos que reconozcan un receptor específico del precursor de los oligodendrocitos, cuya existencia es todavía hipotética. La ventaja de este procedimiento sería el de poderse aplicar luego de un diagnóstico prenatal; su desventaja, la de sólo poderse emplear en enfermedades cuyos efectos no son deletéreos para el embrión o el feto joven.

En las mutaciones puntiformes se puede emplear un ARNt supresor, e imitar a la naturaleza. Pero, indiscutiblemente, tanto por su eficacia como por su atractivo conceptual, el método más prometedor parece ser el de la creación de animales transgénicos.

Se llama transgénico al animal construido mediante la introducción de un gen en una célula germinal. Para ello, se remueve el huevo de una hembra en celo y se lo fertiliza en el laboratorio. Un plásmido recombinante portador del gen deseado se introduce en el pronúcleo masculino del huevo recientemente fertilizado, que a su vez se reintroduce en el útero materno y se le permite llegar a término. El animal resultante se llama transgénico, pues parte de su dotación genética proviene de un organismo diferente. Este tipo de manipulación podría desarrollarse para tratar enfermedades genéticas, pues dota al portador de la enfermedad de un gen normal.

La gran limitación es la dificultad para lograr que un gen se vuelva funcional únicamente en el lugar apropiado, pues uno de los riesgos es su transcripción en células en las que normalmente se halla inactivo. Los experimentos de PALMITTER descritos más arriba despiertan la esperanza de que este problema sea resuelto. Por otro lado, en los últimos tiempos, como lo señala muy acuciosamente MARX (1988), se ha perfeccionado la manera de introducir un gen en un lugar específico del genoma. Con ello ha aumentado las posibilidades de practicar, con éxito, la terapia genética y se está adquiriendo un nuevo método para estudiar la acción de un gen durante el desarrollo.

### *La ingeniería genética*

En lo que se refiere a la biosíntesis de sustancias activas, el futuro se halla en la producción de sustancias superiores a las naturales. En un primer intento, se tratará de producir proteínas y polipéptidos más activos que los que existen naturalmente. En un futuro más lejano, se planea crear sustancias no antigénicas con funciones naturales.

La importancia y la extensión del tema no permiten que esta revisión sea exhaustiva. Los autores quedarán satisfechos si al llegar a este párrafo se ha logrado incentivar a los lectores por este apasionante tema.

En su búsqueda de la verdad, el ser humano ha penetrado en terrenos insospechados; los fundamentos de la vida comienzan a develarse y a su manejo nos precipitamos, ¡esperemos que con otro espíritu que el del aprendiz de brujo! Pero la osadía humana no tiene límites. Como dice NIETZSCHE:

"¡Ahí donde te encuentras sondea!  
¡La fuente está en el fondo!"

### *R É S U M É*

L'enorme essort de la neurogenétique moléculaire est exposé. En partant d'un schéma historique, l'auteur décrit les nouvelles techniques, ses applications actuelles et ses possibilités futures.

### *ZUSAMMENFASSUNG*

Die Genetik und die Neurogenetik haben in den letzten Jahren beträchtliche Fortschritte gemacht. Im vorliegenden Beitrag werden die Vergangenheit, die zeitgenössische

Entwicklung und die Zukunft von ihnen dargestellt und kommentiert. Ein Abschnitt wird der Duchennekrankheit gewidmet.

### BIBLIOGRAFIA

1. ADAMS, R.D. & VICTOR, M. (1981): *Principles of Neurology*, McGraw-Hill Book Co., New York.
2. ANDERSON, W.E. (1984): "Prospects for Human Gene Therapy", *Science*, 226: 401-409.
3. AVERY, O.T., MACLEOD, C.M. & McCARTY, M. (1944): "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types", *J. Exp. Med.* 79: 137-158.
4. BOULANGER, P. *et al.* (1962): *Biochimie Medicale*, Masson et Cie (Ed.), Paris.
5. CHAILLY, J. & KAPLAN, J.C. (1988): "La myopathie de Duchenne: du gene DMD a la dystrophine", *Medecine et Sciences*, 4: 141-150.
6. DARNELL, J., LODISH, H. & BALTIMORE, D. (1986): *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, New York.
7. DREYFUS, J.C. (1987): "Le locus genetique de la maladie d'Alzheimer differe de celui de la proteine amyloide", *Medecine et Sciences*, 3: 620.
8. GILLIAN, C.T. *et al.*, (1987): "A DNA segment encoding two genes very tightly linked to Huntington's disease", *Science*, 238: 950-952.
9. GUSSELLA, J.F. *et al.* (1983): "A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington disease", *Nature*, 306: 234-238.
10. GUSSELLA, J.F. *et al.* (1985): "Deletion of Huntington's locus in Wolf-Hirschorn syndrome", *Nature*, 318: 75-78.
11. JORDAN, B. (1988): "Grandeurs et servitudes de la génétique inverse", *Medecine et Sciences*, 4: 138-140.
12. KAHN, A. & DREYFUS, J.C. (1987): "Régulation positive et négative des enhanceurs", *Medecine et Sciences*, 3 (Suppl.): 32-33.
13. KAHN, A. (1988): "Les antioncogenes en vedette: absence et liaison dangereuse du produit p 110-114 Rb du gene du retinoblastome", *Medecine et Sciences*, 8: 520-521.
14. KAHN, A. (1988): "L'amplification in vitro des fragments d'ADN par PCR (polymérase chain reaction): un tournant en génétique", *Medecine et Sciences*, 8: 515-518.
15. KAN, Y.W. & DOZY, A.M. (1978): "Antenatal diagnosis of sickle cell anaemia by DNA analysis of amniotic fluid cells", *Lancet*, 11: 910-912.
16. LANDEGREN, U. *et al.* (1988): "DNA diagnostics-molecular techniques and automation", *Science*, 242: 229-237.
17. MARTIN, J.B. (1987): "Molecular genetics: applications to the clinical neurosciences", *Science*, 238: 765-772.
18. MARTIN, J.B. (1987): "Genetic linkage in neurologic disease", *N. Eng. J. Med.*, 316: 1018-1020.
19. MARX, J.L. (1988): "Evidence uncovered for a second Alzheimer gene", *Science*, 241: 1432-33.
20. MARX, J.L. (1988): "Gene transfer is coming on target", *Science*, 242: 191-192.
21. MAXAM, A.M. & Gilbert, W. (1977): "A new method for sequencing DNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 560-564.
22. MENDEL, G.: (1865) *Versuche uber pflanzen-hybriden*. Verh Naturforsch Vereins, Brunn. Traducidos por W.A. Rateson (1959) bajo el nombre de *Experimentos en la hibridación de plantas*. Reimpreso en J.A. Peters, *Clasic Papers in Genetics*.
23. MILNER, R.J. & SUTCLIFFE, J.G. (1988): "Molecular neurobiological strategies applied to the nervous system", *Discussion in Neurosciences*, 5: 11-63.
24. MORGAN, T.H. (1926): *The theory of the gene*, Yale University Press.
25. NIREMBERG, M.W. & LEDER, P. (1964): "RNA code words and protein sythesis", *Science*, 145: 1399-1407.
26. PALMERT, M.R. *et al.* (1988): "Amyloid Protein Precursor Messenger RNA: Differential Expression in Alzheimer's Disease", *Science*, 241: 1080-1084.
27. PALMITER, R.D. *et al.* (1987): "En revisiones breves de Medecine et Sciences", *Cell*, 50: 435-443.
28. ROBERT, M. (1988): "La Neurogenetique", *Medecine et Sciences*, 4: 157-167.
29. ROSEMBERG, R.N. (1986): *Neurogenetics: Principles and Practice*, Raven Press (Ed.), New York.
30. SANGER, E., NICKLEN, S. & COULSON, A.R. (1977): "DNA sequencing with chain terminating inhibitors", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467.
31. SCHELLENBERG, G.D. *et al.* (1988): "Absence of linkage of chromosome 21q21 markers to familial Alzheimer's disease", *Science*, 241: 1507-1510.
32. SUTTON, W.S. (1903): "The chromosomes in heredity", *Biol. Bull.*, 4: 231-251.
33. WATSON, J.D. & CRICK, F.H.C. (1953): "A structure for deoxy nucleic acid", *Nature*, 171: 737-738.
34. WATSON, J.D. *et al.* (1987): *Molecular biology of the gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., California.
35. WALTON, J.N. & GARINER-MEDWIN, D. (1981): "Progressive muscular dystrophy and the myotonic disorders", En: *Disorders of Voluntary Muscles*, Walton, J.M., (Ed.). Churchill Livingstone, Edimburgh, London.
36. WERTLECKI, W. *et al.* (1988): "Neurofibromatosis 2: Clinical and DNA linkage studies of a large kindred", *N. Eng. J. Med.*, 319: 278-283.