GRUPO BLR

FUNDAMENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN BIOQUÍMICA Y FARMACIA:

GENÉTICA MOLECULAR, REGULACIÓN GÉNICA Y APLICACIONES DIAGNÓSTICAS

ISBN: 978-9907-852-17-2

Lidia Elizabeth Guzmán Heras
Ronald Andreé Vitonera Rogel

2026

FUNDAMENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN BIOQUÍMICA Y FARMACIA: GENÉTICA MOLECULAR, REGULACIÓN GÉNICA Y APLICACIONES DIAGNÓSTICAS

Lidia Elizabeth Guzmán Heras

Ronald Andreé Vitonera Rogel

AUTORES

UTMACH

Este libro ha sido debidamente examinado y valorado en la modalidad doble par ciego con fin de garantizar la calidad científica.

©Grupo Editorial BLR
Universidad Técnica de Machala
Riobamba – Ecuador
Correo: publicaciones@grupoblr.com
https://grupoblr.com/libros-investigo
REPOSITORIO



Guzmán, L., Vitonera., R. (2026) Fundamentos de biología molecular en bioquímica y farmacia: Genética molecular, regulación génica y aplicaciones diagnósticas. Grupo Editorial BLR.

© Lidia Elizabeth Guzmán Heras
Ronald Andreé Vitonera Rogel

Fundamentos de biología molecular en bioquímica y farmacia: Genética molecular, regulación génica y aplicaciones diagnósticas.

ISBN: 978-9907-852-17-2

El copyright promueve la libertad de expresión, protege la diversidad de ideas y conocimiento, además apoya la libre expresión. Se prohíbe de manera rigurosa la producción o el almacenamiento de esta publicación, ya sea en su totalidad o en parte, está estrictamente prohibido por ley, incluyendo el diseño de la portada, así como su difusión a través de cualquiera de sus medios, ya sean electrónicos, mecánicos, ópticos, de grabación o incluso de fotocopia, sin permiso de los propietarios de los derechos de autor.

Filiación de autores

Lidia Elizabeth Guzmán Heras

Universidad Técnica de Machala

Correo Electrónico: lguzman@utmachala.edu.ec

ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7852-8372

Ronald Andreé Vitonera Rogel

Universidad Técnica de Machala

Correo Electrónico: rvitonera1@utmachala.edu.ec

ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5272-5551

PREFACIO

Fundamentos de Biología Molecular en Bioquímica y Farmacia nace como una propuesta académica para comprender la vida desde su base molecular y conectar ese conocimiento con la práctica profesional en el laboratorio clínico, la bioquímica diagnóstica y la formación científica en salud. En un escenario donde la interpretación de datos genéticos y moleculares es cada vez más decisiva, esta obra busca ofrecer una ruta clara, rigurosa y actualizada para estudiantes de Bioquímica y Farmacia.

El propósito central del libro es integrar los principios clásicos de la biología molecular con sus aplicaciones contemporáneas. A lo largo de sus capítulos, el lector recorre desde la estructura del material genético y el código biológico, hasta la herencia cromosómica, la regulación de la expresión génica, las mutaciones, la variabilidad biológica y las técnicas moleculares empleadas hoy en diagnóstico y biomarcadores.

La organización del contenido responde a una progresión didáctica en cinco unidades. La primera consolida los fundamentos del código genético y los procesos moleculares esenciales; la segunda desarrolla los patrones de herencia y la citogenética humana; la tercera profundiza en los mecanismos de regulación y control de la expresión génica; la cuarta aborda alteraciones moleculares y variabilidad; y la quinta articula herramientas de diagnóstico, técnicas de laboratorio y aplicaciones clínicas.

Desde una perspectiva pedagógica, cada capítulo incorpora objetivos de aprendizaje, preguntas de enfoque, desarrollo conceptual, tablas y figuras de apoyo, actividades y glosario. Esta estructura favorece una formación que va más allá de la memorización: promueve comprensión, análisis crítico e interpretación de resultados en contexto biológico y clínico.

La obra asume además un compromiso metodológico y ético con la precisión científica. En biología molecular, el rigor en el lenguaje, en los métodos y en la interpretación no es opcional: es la base para tomar decisiones confiables. Por ello, el texto enfatiza la lectura crítica de evidencia, la calidad analítica y la relación entre hallazgos moleculares y su relevancia en salud.

Esperamos que este libro acompañe al estudiante tanto en el aula como en el laboratorio, y que se convierta en una herramienta útil para construir criterio profesional. Si al finalizar su estudio se fortalece la capacidad de comprender procesos moleculares, interpretar datos con fundamento y aplicar ese conocimiento con responsabilidad, el propósito de esta obra se habrá cumplido.

ÍNDICE

PREFACIO ..... **i**

ÍNDICE ..... **iii**

ÍNDICE DE TABLAS ..... **xxv**

ÍNDICE DE FIGURAS ..... **xxviii**

CAPÍTULO I **31**

1 FUNDAMENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CÓDIGO GENÉTICO **31**

1.1 Introducción a la Biología Molecular 31

1.2 Objetivos de Aprendizaje 32

1.3 ¿Qué es la biología molecular? 33

1.3.1 Relación con disciplinas afines 34

1.3.2 Organismos modelo en biología molecular 34

1.3.3 Procariotas y eucariotas: dos sistemas moleculares 37

1.4 Historia de la biología molecular: de Mendel al genoma 40

1.4.1 Los precursores: genética clásica y bioquímica 40

1.4.2 El ADN como material genético (1940–1953) 41

1.4.3 El dogma central y el código genético (1953–1966) 42

1.4.4 La era del ADN recombinante (1970–1990) 43

1.4.5 El Proyecto Genoma Humano y la era genómica (1990–presente) 44

1.4.6 La biología molecular de la enfermedad (1949–presente) 46

1.5 El dogma central de la biología molecular 49
1.6 La biología molecular y el bioquímico farmacéutico 53
1.6.1 Aplicaciones en el laboratorio clínico 54
1.6.2 El BQF ante la era molecular: competencias emergentes 55
1.6.3 Ética y responsabilidad en el manejo de información genómica 56
1.6.4 Bioinformática: el puente entre la biología molecular y el laboratorio clínico 57
1.7 Herramientas tecnológicas de la biología molecular: una panorámica 63
1.7.1 Técnicas de amplificación y detección de ácidos nucleicos 63
1.7.2 Secuenciación del ADN 64
1.7.3 Edición genómica: CRISPR-Cas9 64
1.7.4 Perspectivas emergentes: hacia la biología molecular de precisión 66
1.8 Preguntas de Autoevaluación 78
1.9 Glosario 83
CAPÍTULO II 91
2 MOLÉCULAS INFORMACIONALES: ADN, ARN Y PROTEÍNAS 91
2.1 Introducción 91
2.2 Objetivos de Aprendizaje 92
2.3 Preguntas de Enfoque 93
2.4 Nucleótidos: las unidades monoméricas 94

2.4.1 Diferencias funcionales entre ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos 95
2.5 Estructura del ADN: la doble hélice 97
2.5.1 Reglas de Chargaff y apareamiento de bases 97
2.5.2 Características estructurales de la doble hélice 98
2.5.3 Desnaturalización y renaturalización 99
2.6 Estructura del ARN: tipos y funciones 100
2.6.1 Estructuras secundarias del ARN 100
2.6.2 ARN mensajero (ARNm) 101
2.6.3 ARN de transferencia (ARNt) 103
2.6.4 ARN ribosomal (ARNr) 103
2.6.5 ARN no codificantes (ncARN) 104
2.7 Aminoácidos y estructura de proteínas 106
2.7.1 Aminoácidos: estructura general y clasificación 106
2.7.2 Los cuatro niveles de organización estructural 107
2.7.3 Plegamiento de proteínas, chaperonas y enfermedades por mal plegamiento 108
2.7.4 Clasificación funcional de proteínas 109
2.8 Cuantificación de ácidos nucleicos en el laboratorio 111
2.8.1 Espectrofotometría a 260/280 nm 111
2.8.2 Evaluación de integridad del ARN 112
2.9 Preguntas de Autoevaluación 117

2.10 Resumen 123

CAPÍTULO III 125

3 ORGANIZACIÓN DEL GENOMA, CROMOSOMAS Y ELEMENTOS MÓVILES DEL ADN 125

3.1 Introducción 125

3.2 Objetivos de Aprendizaje 126

3.3 Cromatina: eucromatina, heterocromatina y epigenoma 128

3.3.1 Metilación del ADN y las islas CpG 129

3.4 Niveles de empaquetamiento del ADN 130

3.4.1 Nivel 1: El nucleosoma 131

3.4.2 Nivel 2: La fibra de 30 nm (solenoide) 131

3.4.3 Niveles 3–5: Dominios de bucle, cromátidas y cromosoma metafásico 132

3.4.4 Variantes de histonas y su rol funcional 133

3.5 Histonas: modificaciones y remodelación de la cromatina 134

3.5.1 Modificaciones postraduccionales de las colas de histonas 134

3.5.2 Inhibidores de enzimas epigenéticas: terapia epigenética 136

3.5.3 Complejos de remodelación de la cromatina dependientes de ATP 137

3.6 Estructura del cromosoma eucariota y citogenética 138

3.6.1 Regiones estructurales del cromosoma 138

3.6.2 Bandas cromosómicas y cariotipo 140

3.7 Genoma humano: composición y secuencias repetitivas 143

3.7.1 Impronta genómica y metilación diferencial..... 144

3.8 Elementos genéticos móviles: transposones y retrotransposones 146

3.8.1 Transposones de ADN (clase II): mecanismo cortar-ypegar ... 147

3.8.2 Retrotransposones (clase I): mecanismo copiar-y-pegar 148

3.8.3 Silenciamiento de elementos móviles y su evasión en el cáncer 149

3.8.4 Significado biológico de los elementos móviles..... 150

3.8.5 Técnicas de análisis del epigenoma: ChIP-seq y ATACseq 151

3.9 Preguntas de Autoevaluación..... 158

3.10 Glosario 162

3.11 Resumen..... 165

CAPÍTULO IV..... 168

4 CÓDIGO GENÉTICO Y FLUJO DE INFORMACIÓN GENÉTICA: REPLICACIÓN, TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN 168

4.1 Introducción 168

4.2 Objetivos de Aprendizaje..... 169

4.3 El código genético..... 171

4.3.1 Propiedades del código genético..... 171

4.3.2 Excepciones al código genético universal..... 172

4.3.3 Mutaciones y sus consecuencias sobre la proteína 173

4.3.4 Codones, microARN y regulación postranscripcional: más allá del dogma central 174
4.4 Replicación del ADN 175
4.4.1 La maquinaria replicativa eucariota 176
4.4.2 Cadena líder y cadena rezagada 177
4.4.3 Fidelidad de la replicación: mecanismos de corrección 178
4.4.4 El problema de la replicación terminal y la telomerasa 179
4.5 Reparación del ADN 179
4.5.1 Reparación por escisión de bases (BER) 180
4.5.2 Reparación por escisión de nucleótidos (NER) 180
4.5.3 Reparación de emparejamientos erróneos (MMR) 181
4.5.4 BRCA1/BRCA2 y la recombinación homóloga en el cáncer familiar 182
4.5.5 Reparación de roturas de doble cadena (DSBR) 183
4.6 Transcripción eucariota 186
4.6.1 Las ARN polimerasas nucleares eucariotas 187
4.6.2 Iniciación de la transcripción y factores de transcripción 187
4.6.3 Procesamiento del ARNm eucariota 188
4.6.4 Regulación de la transcripción por factores específicos de tejido 189
4.7 Traducción 190
4.7.1 Los ARNt y las aminoacil-ARNt sintetasas 190
4.7.2 El ribosoma eucariota y las fases de la traducción 191

4.7.3 Antibióticos inhibidores de la traducción 192
4.7.4 Regulación de la traducción y respuesta al estrés celular 193
4.8 Preguntas de Autoevaluación 200
4.9 Glosario 205
4.10 Resumen 207
CAPÍTULO V 210
5 PRINCIPIOS DE HERENCIA GENÉTICA 210
5.1 Introducción 210
5.2 Objetivos de Aprendizaje 211
5.3 Conceptos fundamentales de genética mendeliana 213
5.3.1 Terminología esencial 213
5.4 Las leyes de Mendel 214
5.4.1 Primera ley: Principio de la segregación 214
5.4.2 Segunda ley: Principio de la distribución independiente 215
5.5 Tipos de dominancia 216
5.5.1 Dominancia completa 216
5.5.2 Dominancia incompleta 216
5.5.3 Codominancia 216
5.6 Alelos múltiples y sistema ABO 217
5.7 Equilibrio de Hardy-Weinberg 220
5.7.1 Las ecuaciones de Hardy-Weinberg 220
5.7.2 Aplicación clínica: cálculo de frecuencias de portadores 221

5.8 Pleiotropía y expresividad variable 222
5.8.1 Pleiotropía 222
5.8.2 Penetrancia 223
5.8.3 Expresividad variable 223
5.9 Ligamiento genético y mapeo 224
5.9.1 Distancia de mapa: el centimorgan (cM) 224
5.10 Herencia no mendeliana y modificación de las proporciones mendelianas 225
5.11 Preguntas de Autoevaluación 232
5.12 Glosario 236
5.13 Resumen 237
CAPÍTULO VI 240
6 HERENCIA GENÉTICA Y BASES CROMOSÓMICAS DE LA VARIACIÓN 240
6.1 Patrones de Herencia y Herencia No Clásica 240
6.2 Introducción 240
6.3 Objetivos de Aprendizaje 241
6.4 Preguntas de Enfoque 242
6.5 Herencia autosómica dominante 243
6.5.1 Características del árbol genealógico en herencia AD 243
6.5.2 Mecanismos moleculares de dominancia 244
6.5.3 Penetrancia y expresividad en herencia AD 245

6.6 Herencia autosómica recesiva 246
6.6.1 Características del árbol genealógico en herencia AR 247
6.6.2 Consanguinidad y coeficiente de parentesco 247
6.6.3 Ejemplos clínicos de herencia AR 248
6.7 Herencia ligada al cromosoma X 250
6.7.1 Inactivación del cromosoma X: la hipótesis de Lyon 250
6.7.2 Herencia ligada al X recesiva 251
6.7.3 Herencia ligada al X dominante 252
6.7.4 Herencia ligada al Y (holándrica) 253
6.8 Herencia multifactorial y poligénica 254
6.8.1 Modelo umbral de Falconer 255
6.8.2 Heredabilidad 255
6.9 Herencia mitocondrial 255
6.9.1 Enfermedades mitocondriales 257
6.10 Impronta genómica y disomía uniparental 258
6.10.1 Síndromes de Prader-Willi y Angelman 259
6.10.2 Disomía uniparental (DUP) 260
6.11 Anticipación genética y enfermedades por expansión de repeticiones 261
6.12 Conceptos Clave 265
6.13 Actividades de Consolidación 267
6.14 Preguntas de Autoevaluación 268

6.15 Glosario 273

6.16 Resumen 275

CAPÍTULO VII 277

7 CARIOTIPO, CITOGENÉTICA Y ALTERACIONES CROMOSÓMICAS 277

7.1 Introducción 277

7.2 Objetivos de Aprendizaje 278

7.3 Preguntas de Enfoque 279

7.4 El cariotipo humano normal 280

7.4.1 Clasificación morfológica de los cromosomas 280

7.4.2 Técnica de bandeo G y resolución diagnóstica 281

7.4.3 Nomenclatura ISCN básica 281

7.5 Mitosis y meiosis: bases de la división celular 282

7.5.1 Mitosis: división celular somática 282

7.5.2 Meiosis: división especializada para gametos 284

7.6 Anomalías cromosómicas numéricas 285

7.6.1 Aneuploidías autosómicas 286

7.6.2 Aneuploidías de cromosomas sexuales 287

7.6.3 Poliploidías 288

7.7 Anomalías cromosómicas estructurales 289

7.7.1 La translocación Philadelphia: t(9;22) y BCR-ABL1 290

7.8 Técnicas citogenéticas moleculares 293

7.8.1 FISH: hibridación fluorescente in situ 293
7.8.2 Microarrays cromosómicos: CGH y SNP arrays 295
7.8.3 Diagnóstico prenatal citogenético 295
7.9 Mosaicismo cromosómico 296
7.10 Resumen 308
CAPÍTULO VIII 311
8 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y CONTROL MOLECULAR 311
8.1 Niveles de regulación de la expresión génica 314
8.2 Regulación en procariotas: los operones 316
8.2.1 El operón lac: regulación negativa inducible 316
8.2.2 El operón trp: regulación negativa reprimible 318
8.3 Regulación transcripcional en eucariotas 319
8.3.1 Elementos reguladores en cis 319
8.3.2 Factores de transcripción 320
8.3.3 Comunicación enhancer-promotor y TADs 321
8.4 Regulación a nivel de cromatina 322
8.4.1 Modificaciones de histonas y código de histonas 322
8.4.2 Metilación del ADN 323
8.5 Regulación postranscripcional 323
8.5.1 Estabilidad del ARNm 323
8.5.2 Biogénesis y función de los miARN 324

8.5.3 ARN largos no codificantes — lncARN 325
8.5.4 Splicing alternativo 326
8.6 Señalización celular y regulación génica 326
8.6.1 Rutas de señalización y factores de transcripción 327
8.7 Terapias dirigidas a la regulación génica 328
8.7.1 Inhibidores de HDAC 329
8.7.2 Inhibidores de DNMT (hipometilantes) 329
8.7.3 CRISPR-a y CRISPR-i: edición epigenómica 330
8.8 Preguntas de Autoevaluación 337
8.9 Glosario 341
8.10 Resumen 343
CAPÍTULO IX 345
9 MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES Y PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS 345
9.1 Introducción 345
9.2 Objetivos de Aprendizaje 346
9.3 Preguntas de Enfoque 347
9.4 Concepto y clasificación de las modificaciones postraduccionales 348
9.5 Tipos principales de modificaciones postraduccionales 349
9.5.1 Fosforilación 349
9.5.2 Glicosilación 350
9.5.3 Ubiquitinación y modificadores similares a ubiquitina 351

9.5.4 Acetilación y metilación 353
9.5.5 Proteólisis limitada y formación de puentes disulfuro 353
9.6 Plegamiento de proteínas y chaperones moleculares 354
9.6.1 Chaperones Hsp70: ciclo de unión y liberación 355
9.6.2 Chaperoninas Hsp60 (GroEL/GroES): plegamiento en cámara aislada 355
9.6.3 Hsp90 y chaperonas especializadas 356
9.7 9.4 Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) y ERAD 357
9.8 Sistema ubiquitina-proteasoma: el proteasoma 26S 359
9.9 Enfermedades por plegamiento incorrecto: proteinopatías 361
9.9.1 Enfermedad de Alzheimer 361
9.9.2 Enfermedad de Parkinson 362
9.9.3 Enfermedades priónicas 362
9.9.4 Fibrosis quística: CFTR-F508del y terapia con chaperonas farmacológicas 363
9.10 Actividades de Consolidación 367
9.11 Preguntas de Autoevaluación 368
9.12 Glosario 371
9.13 Resumen 373
CAPÍTULO X 375
10 EPIGENÉTICA, SILENCIAMIENTO GÉNICO Y DESREGULACIÓN EN ENFERMEDAD 375
10.1 Introducción 375

10.2 Objetivos de Aprendizaje 376
10.3 Metilación del ADN: escritura, lectura y borrado 377
10.3.1 Familia de las DNMT 378
10.3.2 Islas CpG y metilación del promotor 378
10.4 Código de histonas: escritura, lectura y borrado 380
10.4.1 Tipos de modificaciones y enzimas escritoras 381
10.4.2 Lectura del código: dominios efectores 381
10.4.3 Complejos Polycomb y Trithorax: la memoria epigenética del desarrollo 382
10.5 ARN no codificantes en regulación epigenética 383
10.6 MicroARN (miARN) — mecanismo y relevancia 383
10.6.1 ARN largos no codificantes (lncARN) 384
10.6.2 ARN de interferencia de Piwi (piARN) 385
10.7 Epigenética fisiológica: inactivación del X e impronta genómica 386
10.7.1 Inactivación del cromosoma X: hipótesis de Lyon 386
10.7.2 Impronta genómica: expresión monoalélica dependiente del parental 388
10.8 Desregulación epigenética en cáncer 389
10.8.1 Hermetilación de promotores de genes supresores de tumores 389
10.8.2 Hipometilación global del genoma tumoral 390
10.8.3 Mutaciones en escritores y borradores epigenéticos 390

10.9 Terapias epigenéticas: inhibidores de HDAC y agentes desmetilantes 391
10.9.1 Inhibidores de HDAC (HDACi) 391
10.9.2 Agentes desmetilantes del ADN (hipometilantes) 392
10.9.3 Inhibidores de EZH2, BRD4 y otras dianas epigenéticas emergentes 393
10.10 Actividades de Consolidación 395
10.11 Preguntas de Autoevaluación 397
10.12 Glosario 402
10.13 Resumen 404
CAPÍTULO XI 407
11 MUTACIONES, ALTERACIONES MOLECULARES Y VARIABILIDAD BIOLÓGICA 407
11.1 Mutaciones: Clasificación, Mecanismos Moleculares y Consecuencias Biológicas 407
11.2 Introducción 407
11.3 Objetivos de Aprendizaje 408
11.4 Clasificación de las mutaciones 410
11.4.1 Por extensión: puntuales, de longitud y cromosómicas 410
11.4.2 Por tipo molecular: consecuencias sobre la proteína 410
11.4.3 Por consecuencia fenotípica 411
11.5 Mecanismos de generación de mutaciones espontáneas 412
11.5.1 Errores de replicación 413

11.5.2 Mutaciones espontáneas no replicativas 413
11.6 Mutaciones inducidas: mutágenos físicos, químicos y biológicos 415
11.6.1 Mutágenos físicos 415
11.6.2 Mutágenos químicos 415
11.6.3 Mutágenos biológicos: transposones y virus 416
11.7 Sistemas de reparación del ADN y enfermedades asociadas 417
11.7.1 Reparación por escisión de bases (BER) 417
11.7.2 Reparación por escisión de nucleótidos (NER) 417
11.7.3 Reparación de bases no apareadas (MMR) 418
11.7.4 Reparación de roturas de doble hebra (DSB) 418
11.8 Nomenclatura HGVS e interpretación de variantes 419
11.8.1 Sistema HGVS 419
11.8.2 Clasificación de variantes ACMG/AMP (2015) 420
11.9 Mutaciones somáticas en cáncer: del conductor al pasajero 421
11.10 Concepto Clave 423
11.11 Actividades de Consolidación 424
11.12 Preguntas de Autoevaluación 425
11.13 Glosario 431
11.14 Resumen 433
CAPÍTULO XII 435
12 BASES MOLECULARES DE LAS ENFERMEDADES HEREDITARIAS Y ADQUIRIDAS 435

12.1 Introducción 435

12.2 Objetivos de Aprendizaje 436

12.3 Enfermedades monogénicas de pérdida de función 437

12.3.1 Fibrosis quística: el paradigma de la terapia dirigida al defecto molecular 438

12.3.2 Fenilcetonuria: bloqueo metabólico por déficit enzimático 440

12.3.3 Hemoglobinopatías: talasemias y HbS 440

12.4 Enfermedades de almacenamiento lisosomal: déficit de enzimas catabólicas 441

12.5 Enfermedades de ganancia de función y mecanismos dominantes 443

12.5.1 Enfermedad de Huntington: expansión tóxica de poliglutaminas 443

12.5.2 Rasopatías: activación constitutiva del eje RAS/MAPK 444

12.6 Oncogénesis: modelo de dos golpes, oncogenes y supresores de tumores 446

12.6.1 Hipótesis de Knudson y el modelo de dos golpes 446

12.6.2 Proto-oncogenes y oncogenes 446

12.6.3 Secuencia adenoma-carcinoma: un modelo integrador de oncogénesis 447

12.7 Enfermedades multifactoriales: interacción genambiente 448

12.8 Distrofias musculares: modelos de déficit estructural y terapia génica 449

12.9 Actividades de Consolidación 452

12.10 Preguntas de Autoevaluación 454
12.11 Glosario 460
12.12 Resumen 462
CAPÍTULO XII 464
13 TÉCNICAS MOLECULARES, DIAGNÓSTICO Y BIOMARCADORES 464
13.1 Técnicas de Análisis de Ácidos Nucleicos 464
13.2 Introducción 464
13.3 Objetivos de Aprendizaje 465
13.4 Extracción y control de calidad de ácidos nucleicos 467
13.4.1 Principios generales de extracción 467
13.4.2 Control de calidad del ADN 467
13.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 469
13.5.1 Principio y ciclos de la PCR 469
13.5.2 Diseño de cebadores 470
13.5.3 Variantes de la PCR 470
13.6 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) y RTqPCR 472
13.6.1 Principio de la qPCR 472
13.6.2 RT-qPCR: cuantificación de expresión génica 473
13.7 Electroforesis en gel de agarosa y poliacrilamida 474
13.7.1 Principio y resolución 474
13.7.2 Interpretación de un gel de PCR 475

13.8 Hibridación molecular: Southern, Northern blotting y sondas.. 476
13.8.1 Southern blotting 476
13.8.2 Northern blotting y análisis de ARN 476
13.8.3 FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)..... 477
13.9 Secuenciación Sanger: principio, aplicaciones y limitaciones.. 477
13.9.1 Principio del método didesoxi 477
13.9.2 Aplicaciones y limitaciones..... 478
13.10 Actividades de Consolidación 481
13.11 Preguntas de Autoevaluación..... 483
13.12 Glosario 489
13.13 Resumen..... 491
CAPÍTULO XIV 493
14 TÉCNICAS CITOGENÉTICAS Y MOLECULARES AVANZADAS..... 493
14.1 Introducción 493
14.2 Objetivos de Aprendizaje..... 494
14.3 Preguntas de Enfoque..... 495
14.4 FISH: hibridación fluorescente in situ..... 495
14.4.1 Principio y flujo de trabajo 495
14.4.2 Tipos de sondas FISH..... 496
14.5 Arrays cromosómicos: aCGH y SNP-array 498
14.5.1 Hibridación genómica comparativa en array (aCGH)..... 498

14.5.2 SNP-array 498
14.6 Secuenciación de nueva generación (NGS): flujo de trabajo 499
14.6.1 Preparación de librería..... 499
14.6.2 Secuenciación por síntesis (Illumina)..... 500
14.6.3 Análisis bioinformático 500
14.6.4 Tipos de análisis NGS clínicos..... 501
14.7 PCR digital (dPCR): cuantificación absoluta..... 502
14.7.1 Principio de la PCR de gotitas digitales (ddPCR)..... 502
14.7.2 Aplicaciones clínicas de la ddPCR..... 503
14.8 CRISPR-Cas9 como herramienta de análisis y diagnóstico 504
14.9 MLPA: amplificación de sondas dependiente de ligación multiplex 505
14.10 Actividades de Consolidación 508
14.11 Preguntas de Autoevaluación..... 510
14.12 Glosario 516
14.13 Resumen..... 519
CAPÍTULO XV 521
15 BIOMARCADORES, DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y ROL DEL BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO 521
15.1 Introducción 521
15.2 Objetivos de Aprendizaje..... 522
15.3 Preguntas de Enfoque..... 523

15.4 Clasificación y validación de biomarcadores moleculares 524
15.4.1 Categorías funcionales de biomarcadores 524
15.4.2 Validación de biomarcadores: etapas y estándares 525
15.5 Biomarcadores oncológicos moleculares: diagnóstico y selección terapéutica 526
15.5.1 Del diagnóstico histológico al perfil molecular 526
15.5.2 Inmuno-oncología: biomarcadores de respuesta a inhibidores de puntos de control 527
15.6 Diagnóstico prenatal no invasivo (DPNI) y preimplantacional (DGP) 528
15.6.1 DPNI: ADN fetal libre en plasma materno 528
15.6.2 Diagnóstico genético preimplantacional (DGP) 529
15.7 Farmacogenómica clínica: el bioquímico farmacéutico en la medicina de precisión 530
15.7.1 Principios de farmacogenómica 530
15.7.2 El bioquímico farmacéutico como especialista en farmacogenómica 532
15.8 Terapias avanzadas: ARN terapéutico y terapia génica 533
15.8.1 Oligonucleótidos terapéuticos 533
15.8.2 Terapia génica y edición genómica 534
15.9 El rol del bioquímico farmacéutico en el ecosistema de la medicina molecular 535
15.10 Actividades de Consolidación 538

15.11 Preguntas de Autoevaluación 540

15.12 Glosario 547

15.13 Resumen 549

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 552

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de características moleculares clave en procariotas y eucariotas 38
Tabla 2. Hitos principales en la historia de la biología molecular. 48
Tabla 3. Campos de aplicación de la biología molecular en Bioquímica y Farmacia. 61
Tabla 4. Comparación de las principales tecnologías de secuenciación en uso clínico 65
Tabla 5. Comparación estructural entre ADN y ARN 96
Tabla 6. Tipos de ARN y sus funciones principales. 105
Tabla 7. Principales modificaciones de histonas y su efecto sobre la expresión génica. 135
Tabla 8. Componentes estructurales del cromosoma eucariota y su relevancia clínica. 141
Tabla 9. Tipos de mutaciones puntuales y sus consecuencias sobre la secuencia proteica. 174
Tabla 10. Mecanismos de reparación del ADN y enfermedades asociadas a su deficiencia. 184
Tabla 11. Sistema ABO: genotipos, fenotipos, antígenos y anticuerpos. 218
Tabla 12. Tipos de dominancia y modificaciones de las proporciones mendelianas. 226
Tabla 13. Características comparativas de los patrones de herencia monogénica. 254
Tabla 14. Enfermedades genéticas por expansión de repeticiones de trinucleótidos. 262

Tabla 15. Comparación de métodos de diagnóstico prenatal citogenético. 295
Tabla 16. Niveles jerárquicos de regulación de la expresión génica en eucariotas. 315
Tabla 17. Inhibidores de modificadores epigenéticos aprobados clínicamente. 332
Tabla 18. Principales proteinopatías: proteína implicada, tipo de agregado y estrategias terapéuticas. 364
Tabla 19. Clasificación de las mutaciones puntuales según efecto sobre la proteína. 411
Tabla 20. Mutágenos químicos representativos: mecanismo y lesión generada. 415
Tabla 21. Enfermedades de almacenamiento lisosomal: enzima deficiente, sustrato acumulado y terapia disponible. 442
Tabla 22. Principales oncogenes, tipo de mutación activadora y tumores asociados. 447
Tabla 23. Parámetros de control de calidad del ADN/ARN extraído. 468
Tabla 24. Variantes de la PCR y sus aplicaciones en el laboratorio clínico. 470
Tabla 25. Tipos de sondas FISH, sus blancos y aplicaciones clínicas. 496
Tabla 26. Comparación de los principales tipos de análisis NGS en clínica. 502
Tabla 27. Categorías funcionales de biomarcadores moleculares con ejemplos en oncología y enfermedades hereditarias. 524

Tabla 28. Pares gen-fármaco de mayor relevancia clínica en farmacogenómica..... 530

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La biología molecular como disciplina integradora 37
Figura 2. Hitos históricos de la biología molecular (1944–2003)... 47
Figura 3. Dogma central de la biología molecular. 52
Figura 4. Esquema simplificado de la doble cadena del ADN. 99
Figura 5. Estructura secundaria de horquilla (stem-loop) del ARN. 102
Figura 6. Niveles de organización estructural de las proteínas... 111
Figura 7. Jerarquía estructural de la compactación del ADN eucariota. 133
Figura 8. Estructura esquemática de un cromosoma submetacéntrico humano con patrón de bandas G. 141
Figura 9. Comparación de mecanismos de transposición de clase I y clase II. 149
Figura 10. Horquilla de replicación del ADN eucariota. 178
Figura 11. Selección del mecanismo de reparación del ADN según el tipo de lesión. 186
Figura 12. Ciclo de elongación de la traducción eucariota. 193
Figura 13. Cuadro de Punnett para el cruce monohíbrido Aa × Aa. 214
Figura 14. Bioquímica del sistema ABO de grupos sanguíneos.. 219
Figura 15. Distribución de frecuencias genotípicas según el equilibrio de Hardy-Weinberg. 221
Figura 16. Árbol genealógico típico de herencia autosómica dominante. 246
Figura 17. Árbol genealógico típico de herencia autosómica recesiva. 250

Figura 18. Árbol genealógico de herencia ligada al X recesiva. .. 253
Figura 19. Esquema simplificado de bandas G en el cromosoma 1 humano. 282
Figura 20. Comparación esquemática entre mitosis y meiosis. ... 285
Figura 21. Mecanismo de la translocación Philadelphia t(9;22)(q34;q11.2). 292
Figura 22. Modelo del operón lac de E. coli en estados reprimido e inducido. 319
Figura 23. Biogénesis y mecanismo de acción de los microARN (miARN). 325
Figura 24. Ruta de señalización RAS/MAPK desde el receptor de EGF hasta la activación de genes de proliferación. 328
Figura 25. Cascada del sistema ubiquitina-proteasoma. 352
Figura 26. Rutas de asistencia al plegamiento por chaperones moleculares. 357
Figura 27. Tráfico intracelular de proteínas secretadas y de membrana. 363
Figura 28. Ciclo de metilación y desmetilación del ADN. 380
Figura 29. ARN no codificantes como reguladores epigenéticos. 386
Figura 30. Principales mecanismos de mutación espontánea. 414
Figura 31. Vía de señalización RAS/MAPK con puntos de mutación oncogénica frecuentes y fármacos dirigidos. 445
Figura 32. Etapas y componentes de la PCR convencional. 471
Figura 33. Flujo de la secuenciación Sanger con electroforesis capilar. 479
Figura 34. Principio de la ddPCR. 504

Figura 35. Roles del bioquímico farmacéutico en el ecosistema de la medicina molecular. 536

CAPÍTULO I

1 FUNDAMENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CÓDIGO GENÉTICO

1.1 Introducción a la Biología Molecular

La biología molecular constituye uno de los pilares fundamentales de las ciencias biomédicas del siglo XXI. Surgida en la confluencia entre la bioquímica, la genética y la física, esta disciplina se ocupa de estudiar los procesos biológicos a su nivel más esencial: el de las moléculas que almacenan, transmiten y ejecutan la información genética. Comprender cómo el ADN codifica instrucciones para fabricar proteínas, cómo esas instrucciones se leen, regulan y eventualmente fallan, es comprender las bases de la vida misma y de sus enfermedades (Alberts et al., 2022).

Para el estudiante de Bioquímica y Farmacia, la biología molecular no es un tema abstracto: es el lenguaje que subyace a la mayoría de las pruebas diagnósticas avanzadas, al diseño racional de fármacos, a la interpretación de los hallazgos de laboratorio y al asesoramiento sobre riesgos genéticos. Desde la detección del SARS-CoV-2 mediante PCR hasta el diseño de biofármacos basados en proteínas recombinantes, la biología molecular permea el ejercicio profesional cotidiano del bioquímico farmacéutico (BQF), como señala Harvey (2019). Esta permeabilidad no es accidental: refleja el hecho de que toda patología —infecciosa, genética, neoplásica o metabólica— puede describirse, en última instancia, en términos de alteraciones moleculares.

Este capítulo introduce la disciplina en su dimensión histórica, conceptual y aplicada. Se traza la evolución del pensamiento biológico desde las leyes de Mendel hasta la era genómica, se presenta el dogma central como marco organizador del conocimiento molecular, se examinan las excepciones que enriquecen ese marco, y se exploran los roles emergentes que la biología molecular abre al BQF en el laboratorio clínico del siglo XXI (Lodish et al., 2021). El objetivo no es memorizar una cronología, sino construir el esquema conceptual que permita aprender con sentido crítico los mecanismos moleculares que se desarrollan en los capítulos subsiguientes.

1.2 Objetivos de Aprendizaje

1. Definir la biología molecular como disciplina científica, delimitando su objeto de estudio y sus relaciones con la bioquímica, la genética y la farmacia.

2. Identificar los hitos históricos fundamentales que dieron origen a la biología molecular moderna, desde los experimentos de Mendel hasta el Proyecto Genoma Humano.

3. Explicar el dogma central de la biología molecular y su importancia como marco organizador del flujo de información genética.

4. Relacionar los conceptos fundamentales de la biología molecular con las competencias diagnósticas, analíticas y farmacéuticas del bioquímico farmacéutico.

5. Reconocer las aplicaciones de la biología molecular en el laboratorio clínico, en el diseño de fármacos y en el diagnóstico molecular.

6. Analizar las excepciones al dogma central y su relevancia clínica, incluyendo retrovirus, ribozimas y ARN no codificantes.

Preguntas de Enfoque

1. ¿Qué distingue a la biología molecular de otras disciplinas biológicas como la bioquímica clásica o la genética clásica?

2. ¿Cómo el descubrimiento de la doble hélice del ADN transformó la comprensión de la herencia y de la enfermedad?

3. ¿En qué sentido el dogma central de la biología molecular es una herramienta conceptual y no solo una descripción de procesos moleculares?

4. ¿Qué pruebas del laboratorio clínico son imposibles de comprender sin fundamentos de biología molecular?

5. ¿Cómo ha cambiado el rol del bioquímico farmacéutico con el advenimiento de las tecnologías moleculares?

1.3 ¿Qué es la biología molecular?

La biología molecular puede definirse como la rama de la biología que estudia los procesos celulares a nivel molecular, con especial énfasis en las interacciones entre las macromoléculas que portan y ejecutan la información genética: el ADN, el ARN y las proteínas (Watson et al.,

2014). A diferencia de la bioquímica clásica, que se centra en las transformaciones químicas dentro de la célula, la biología molecular pone el acento en el *flujo de información*: cómo la secuencia de bases nitrogenadas en el ADN determina la secuencia de aminoácidos en una proteína y cómo esa proteína ejerce una función biológica específica.

Esta distinción tiene consecuencias profundas para el laboratorio clínico. Conocer la estructura tridimensional de una enzima es bioquímica; entender qué mutación en el gen que la codifica altera esa estructura y provoca una enfermedad es biología molecular. Ambas perspectivas son complementarias e indispensables: la bioquímica proporciona los mecanismos de reacción, mientras que la biología molecular proporciona la lógica informacional que los gobierna. Para el BQF, dominar ambas perspectivas es requisito para interpretar correctamente los resultados que emanan del laboratorio molecular (Nelson & Cox, 2021).

1.3.1 Relación con disciplinas afines

La biología molecular ocupa una posición integradora entre varias disciplinas (Figura 1):

1.3.2 Organismos modelo en biología molecular

Gran parte del conocimiento de la biología molecular se construyó a partir del estudio de unos pocos **organismos modelo**: organismos con características que los hacen especialmente adecuados para investigación —ciclo de vida corto, genoma pequeño o bien caracterizado, fácil manipulación genética, bajo costo de

mantenimiento. El bacteriófago T4 y *Escherichia coli* fueron los sistemas de elección para los trabajos fundacionales de replicación y transcripción. *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadería) ha sido fundamental para comprender el ciclo celular y la respuesta a daño en el ADN. *Caenorhabditis elegans* (nematodo) fue clave en el descubrimiento de la apoptosis y el ARN de interferencia. El ratón (*Mus musculus*) es el organismo modelo de elección para estudios en mamíferos, incluyendo el primer modelo animal de muchas enfermedades humanas (Alberts et al., 2022).

Para el BQF, esta historia de organismos modelo es relevante porque buena parte de la terminología del laboratorio molecular —expresión heteróloga de proteínas, clonación en vectores, ensayos de complementación— tiene su origen en los sistemas procariotas y de levaduras. Comprender por qué estos sistemas son «más simples» que los mamíferos —menos regulación, no hay intrones que eliminar, ciclos más rápidos— es clave para entender las limitaciones de ciertos sistemas de expresión y la relevancia de validar hallazgos moleculares en sistemas más cercanos al humano (Lodish et al., 2021).

Genética: Mientras la genética clásica estudia la herencia como fenómeno observable —los patrones de transmisión de caracteres de generación en generación—, la biología molecular explora los mecanismos moleculares subyacentes: cómo se replica el ADN, cómo se transcriben los genes, cómo los cambios en la secuencia nucleotídica producen cambios en el fenotipo (Griffiths et al., 2020).

Bioquímica: Ambas comparten el interés por las macromoléculas, pero la biología molecular hace énfasis en la información codificada en su secuencia, no solo en su reactividad química. La bioquímica pregunta «¿cómo funciona esta enzima?»; la biología molecular pregunta «¿qué gen la codifica, cómo se regula su expresión y qué ocurre cuando ese gen muta?» (Harvey, 2019).

Biología celular: La biología molecular provee los mecanismos moleculares que explican los eventos celulares observados al microscopio. La división celular, la apoptosis, la migración celular y la diferenciación tisular son, en última instancia, procesos gobernados por programas de expresión génica.

Farmacología y farmacia: El diseño de fármacos de nueva generación —inhibidores específicos de enzimas, anticuerpos monoclonales, terapias génicas, ARN de interferencia— es inseparable de la biología molecular (Relling & Evans, 2015). Comprender el blanco molecular de un fármaco exige conocer la estructura y función de la proteína diana.

Microbiología e inmunología: La caracterización molecular de los patógenos, la identificación de factores de virulencia, el diseño de vacunas recombinantes y el estudio de los mecanismos de resistencia antimicrobiana son áreas donde la biología molecular y la microbiología se fusionan.

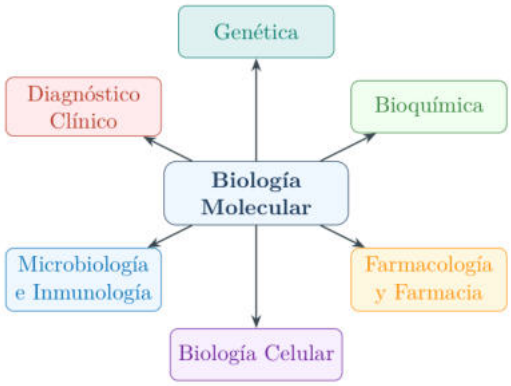


Figura 1. La biología molecular como disciplina integradora

La biología molecular conecta múltiples disciplinas biomédicas, proporcionando el marco molecular para comprender la herencia, la farmacología, el diagnóstico y la microbiología. Elaboración propia basada en Alberts et al. (2022).

1.3.3 Procariotas y eucariotas: dos sistemas moleculares

Un eje organizador fundamental de la biología molecular es la distinción entre organismos **procariotas** (bacterias y arqueas) y **eucariotas** (hongos, protistas, plantas y animales, incluidos los humanos). Esta distinción no es meramente taxonómica: implica diferencias profundas en la maquinaria molecular que el BQF debe conocer para interpretar correctamente los resultados del laboratorio y comprender el mecanismo de acción de los antibióticos.

En los **procariotas**: el ADN es circular y carece de histonas en sentido estricto; la transcripción y la traducción son procesos acoplados que ocurren simultáneamente en el citoplasma; la ARN polimerasa bacteriana es una sola enzima (holoenzima con subunidad σ); los

ribosomas son 70S (subunidades 30S + 50S). En los **eucariotas**: el ADN es lineal y se organiza en cromatina asociada a histonas; la transcripción ocurre en el núcleo y la traducción en el citoplasma (separación espaciotemporal); existen tres ARN polimerasas especializadas (I, II, III); los ribosomas son 80S (subunidades 40S + 60S) (Lodish et al., 2021).

Esta distinción tiene importancia farmacológica directa: muchos antibióticos actúan selectivamente sobre la maquinaria molecular bacteriana (ribosomas 70S, ARN polimerasa bacteriana, síntesis de pared celular) sin afectar la maquinaria eucariota del huésped. Conocer las diferencias moleculares entre ambos sistemas permite comprender por qué los antibióticos tienen el espectro de acción que tienen y por qué son relativamente no tóxicos para las células humanas (Harvey, 2019).

Tabla 1. Comparación de características moleculares clave en procariotas y eucariotas

Característica	**Procariotas**	**Eucariotas**
Organización del ADN	Circular, sin histonas	Lineal, con histonas
Localización del ADN	Citoplasma (nucleoide)	Núcleo (membrana nuclear)
ARN polimerasa	Una (holoenzima + σ)	Tres (ARN Pol I, II, III)
Ribosomas	70S (30S + 50S)	80S (40S + 60S)
Transcripción/traducción	Acopladas en citoplasma	Separadas (núcleo/citoplasma)
Procesamiento del ARNm	Ausente (sin intrones)	Splicing, 5'-cap, poli-A
Intrones	Ausentes (mayormente)	Presentes en la mayoría de genes

Compartimentalización	No (un compartimento)	Sí: núcleo, citoplasma, organelos
Regulación transcripcional	Operones, σ factor	Potenciadores, silenciadores, factores
Complejidad del genoma	Pequeño (Mb a decenas Mb)	Grande (108–1011 pb)

Fuente: Alberts et al. (2022) y Lodish et al. (2021).

Nota. Esta distinción explica la selectividad de muchos antibióticos que actúan sobre blancos moleculares exclusivamente bacterianos.

Concepto Clave

La **biología molecular** es la disciplina que estudia los mecanismos moleculares que subyacen a los procesos biológicos, particularmente el almacenamiento, transmisión y expresión de la información genética contenida en el ADN. Su objeto de estudio se sitúa en la interfaz entre la bioquímica, la genética y la biología celular (Alberts et al., 2022).

¡Importante!

Error frecuente: Confundir los términos **gen**, **genoma** y **cromosoma** como si fueran sinónimos. El **gen** es una unidad funcional discreta: una secuencia de ADN que codifica un ARN o una proteína. El **genoma** es el conjunto *completo* del material genético de un organismo, incluyendo genes codificantes y las vastas regiones no codificantes (≈98.5 % del genoma humano). El **cromosoma** es la unidad estructural de empaquetamiento: el genoma humano diploide se organiza en 46 cromosomas. Usar estos términos imprecisamente conduce a errores

graves en la interpretación de resultados moleculares (Strachan & Read, 2019).

1.4 Historia de la biología molecular: de Mendel al genoma

La biología molecular no surgió de un solo descubrimiento, sino de una serie de hitos experimentales que se acumularon durante más de un siglo. Comprender esta historia permite entender por qué la disciplina es como es y hacia dónde se dirige. La Figura 2 sintetiza los hitos más relevantes desde 1944 hasta 2003.

1.4.1 Los precursores: genética clásica y bioquímica

El fundamento de la biología molecular se estableció antes de que la disciplina tuviera nombre. Gregor Mendel (1866) demostró que los caracteres hereditarios se transmiten en unidades discretas —los genes— siguiendo patrones matemáticos precisos (Nussbaum et al., 2016). Sin embargo, Mendel no sabía qué era un gen químicamente. A principios del siglo XX, Thomas Hunt Morgan y sus colaboradores establecieron que los genes se localizan en los cromosomas, y demostraron el ligamiento genético mediante experimentos con *Drosophila melanogaster* (Strachan & Read, 2019).

Paralelamente, la bioquímica identificaba las macromoléculas de la célula. En 1869, Friedrich Miescher aisló por primera vez la sustancia que llamó «nucleína» del núcleo celular —lo que hoy conocemos como ADN—. Sin embargo, durante décadas se creyó que las proteínas, con sus 20 aminoácidos diferentes, eran la molécula de la herencia. El ADN, con solo cuatro bases, parecía demasiado simple

para portar la complejidad de la información biológica (Watson et al., 2014).

1.4.2 El ADN como material genético (1940–1953)

El giro definitivo ocurrió entre 1940 y 1953. El experimento de Avery, MacLeod y McCarty (1944) demostró que el principio transformante de Griffith era el ADN: el tratamiento con DNasa destruía el principio transformante, mientras que RNasa y proteasas no lo hacían. Este resultado fue inicialmente recibido con escepticismo por la comunidad científica, en parte por la dificultad para aceptar que una molécula de apenas cuatro tipos de monómeros pudiera portar información tan compleja (Lewin et al., 2022). En 1952, Hershey y Chase confirmaron mediante radiomarcaje con ^{32}P (incorporado al ADN) y ^{35}S (incorporado a las proteínas) que el ADN —no la envoltura proteica— es el material genético del fago T2: solo el ^{32}P penetraba en la bacteria huésped y se encontraba en la progenie viral.

El año 1953 marcó el punto de inflexión definitivo: James Watson y Francis Crick, usando datos de difracción de rayos X obtenidos por Rosalind Franklin y Maurice Wilkins, propusieron la estructura de doble hélice antiparalela del ADN (Watson & Crick, 1953). Esta estructura explicaba de inmediato el mecanismo de la herencia: las dos cadenas complementarias podían separarse y cada una servir como molde para sintetizar una copia idéntica.

En 1958, Meselson y Stahl (1958) confirmaron experimentalmente el modo de replicación semiconservativa usando ADN marcado con ^{15}N y centrifugación en gradiente de densidad de CsCl. Este experimento —

considerado «el más bello de la biología»— demostró que cada cadena del ADN progenitor sirve de molde para la síntesis de la cadena hija.

¿Sabías que. . . ?

La fotografía 51, obtenida por Rosalind Franklin mediante cristalografía de rayos X en 1952, fue crucial para deducir la estructura de doble hélice del ADN. Watson y Crick tuvieron acceso a esa imagen sin el conocimiento de Franklin. El Premio Nobel de Fisiología o Medicina 1962 fue otorgado a Watson, Crick y Wilkins;

Franklin había fallecido en 1958 y los Premios Nobel no se otorgan póstumamente. Su contribución tardó décadas en ser reconocida en toda su dimensión (Watson et al., 2014).

1.4.3 El dogma central y el código genético (1953–1966)

Tras el descubrimiento de la doble hélice, Francis Crick formuló en 1958 (y refinó en 1970) el **dogma central de la biología molecular**: la información fluye del ADN al ARN y del ARN a las proteínas (Crick, 1970). Este principio organizó toda la investigación posterior durante décadas.

El desciframiento del código genético, completado en 1966, fue impulsado por los trabajos de Nirenberg y Matthaei (1961), quienes en 1961 utilizaron un polirribonucleótido artificial de uridina (poli-U) para demostrar que el codón UUU codificaba fenilalanina, abriendo el camino para descifrar los 64 codones del código genético. El trabajo de Khorana completó la asignación de todos los codones, y el conjunto del código fue publicado en 1966 (Lewin et al., 2022).

El modelo del operón bacteriano, propuesto por Jacob y Monod (1961) en 1961, estableció que la expresión génica está regulada coordinadamente: genes con funciones relacionadas se expresan juntos bajo el control de un operador y un represor. Este descubrimiento revolucionó la comprensión de cómo los organismos responden adaptativamente a su ambiente a nivel molecular, y sentó las bases de toda la biología molecular de la regulación génica.

El código genético descifrado resultó ser casi universal: los mismos 64 codones especifican los mismos 20 aminoácidos en organismos tan distintos como bacterias, plantas y humanos, lo que evidencia el origen común de la vida en la Tierra. Sin embargo, existen excepciones significativas: las mitocondrias utilizan un código genético ligeramente diferente (por ejemplo, UGA codifica triptófano en mitocondrias humanas, en lugar de ser un codón de terminación), y algunos organismos unicelulares recodifican codones específicos. Estas excepciones son relevantes para el BQF: los genes mitocondriales y sus mutaciones —que causan miopatías, encefalopatías y sorderas hereditarias— se rigen por estas reglas alternativas del código genético mitocondrial (Strachan & Read, 2019).

1.4.4 La era del ADN recombinante (1970–1990)

El descubrimiento de las enzimas de restricción por Werner Arber, Daniel Nathans y Hamilton Smith en la década de 1970 (Premio Nobel 1978) abrió la era del ADN recombinante. Por primera vez fue posible cortar el ADN en posiciones específicas, unir fragmentos de distintos organismos y clonarlos en bacterias (Alberts et al., 2022). Esta

tecnología permitió producir insulina humana recombinante en 1982 —el primer biofármaco de este tipo—, transformando radicalmente el tratamiento de la diabetes mellitus.

Los trabajos de Kornberg (1974), galardonado con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 1959 junto a Severo Ochoa, describieron las propiedades de la ADN polimerasa I de *Escherichia coli*, estableciendo los principios fundamentales de la síntesis de ADN in vitro y sentando las bases bioquímicas que décadas después permitirían el desarrollo de la PCR.

La invención de la PCR por Kary Mullis en 1983 (Premio Nobel 1993) transformó radicalmente el campo: por primera vez era posible amplificar in vitro millones de copias de un fragmento específico de ADN a partir de cantidades mínimas de muestra (Mullis, 1990). La PCR, combinada con la secuenciación de Sanger et al. (1977) mediante terminación de cadena con didesoxinucleótidos, hizo posible el análisis rutinario de genes específicos en muestras clínicas.

1.4.5 El Proyecto Genoma Humano y la era genómica (1990–presente)

El Proyecto Genoma Humano (PGH), iniciado en 1990 y completado en 2003, secuenció los 3,2 × 10^9 pb del genoma humano haploide. Sus hallazgos sorprendieron al mundo científico: el genoma humano contiene apenas unos 20.000–25.000 genes codificantes de proteínas, representando solo el ∼1.5 % del ADN total (Strachan & Read, 2019). El borrador inicial fue publicado simultáneamente en 2001 por el consorcio público (International Human Genome Sequencing

Consortium, 2001) y por Celera Genomics (Venter et al., 2001). La secuencia de referencia completa se anunció el 14 de abril de 2003, en el 50 aniversario del descubrimiento de la doble hélice (Collins et al., 2003).

Desde entonces, la secuenciación masiva paralela (*Next Generation Sequencing*, NGS) ha reducido el costo de secuenciar un genoma humano completo de miles de millones de dólares en 2003 a cifras accesibles en la práctica clínica actual, democratizando el diagnóstico genómico (Metzker, 2010). El desarrollo de CRISPR-Cas9 como herramienta de edición genómica programable por Jinek et al. (2012) ha abierto posibilidades sin precedente en terapia génica, corrección de mutaciones patogénicas y modelado de enfermedades.

El impacto del PGH en el diagnóstico clínico ha sido transformador. Gracias a la disponibilidad de la secuencia de referencia del genoma humano y a las tecnologías de secuenciación derivadas, es posible hoy identificar la causa genética de enfermedades raras en pacientes que antes permanecían sin diagnóstico durante años —la llamada «odisea diagnóstica». Se estima que la secuenciación del exoma o del genoma completo puede proporcionar un diagnóstico molecular en el 30–50 % de los pacientes con enfermedades raras sin diagnóstico previo (Strachan & Read, 2019). Para el BQF que trabaja en un laboratorio de genética molecular, comprender el alcance y las limitaciones de estas herramientas genómicas —y comunicarlas con rigor a los clínicos— es una responsabilidad profesional fundamental.

Otro resultado transformador del PGH fue la revelación de que la mayor parte del genoma humano —antes etiquetado peyorativamente como «ADN basura» (término obsoleto)— es transcripcionalmente activo y produce una gran cantidad de ARN no codificantes con funciones reguladoras. El proyecto ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements), iniciado en 2003 como continuación del pgh, mapeó millones de elementos funcionales en el genoma humano, revelando que la complejidad biológica humana no reside solo en los 20.000 genes codificantes, sino en la sofisticada red de regulación génica que los controla (Alberts et al., 2022).

1.4.6 La biología molecular de la enfermedad (1949–presente)

Paralelamente al desarrollo de las herramientas moleculares, la biología molecular comenzó a iluminar las bases moleculares de las enfermedades humanas. En 1949, Linus Pauling describió la anemia falciforme como la primera «enfermedad molecular» al demostrar que la hemoglobina de los pacientes afectados migraba de manera diferente en electroforesis; años después, Ingram (1957) identificó la sustitución Glu→Val en la posición 6 de la cadena beta de la hemoglobina como responsable del defecto, mostrando por primera vez cómo un cambio de un solo aminoácido —consecuencia de una mutación puntual en el ADN— podía causar una enfermedad grave.

Este paradigma —una mutación →una proteína alterada →un fenotipo patológico— fue extraordinariamente fructífero durante las siguientes décadas. La identificación del gen *CFTR* en la fibrosis quística (Kerem et al., 1989), del gen de la distrofina en la distrofia muscular de

Duchenne, del gen *HTT* en la enfermedad de Huntington (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993) y de cientos de otros genes de enfermedades monogénicas transformó la comprensión, el diagnóstico y gradualmente el tratamiento de las enfermedades genéticas. Para el BQF, esta historia no es solo historia: cada uno de estos genes es una diana potencial de diagnóstico molecular que puede encontrarse en el laboratorio clínico.

La biología molecular del cáncer tomó un camino paralelo. A partir de la hipótesis de Knudson Jr. (1971) sobre los genes supresores de tumores, el trabajo de Fearon y Vogelstein (1990) demostró que el cáncer colorrectal resulta de la acumulación secuencial de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores, estableciendo el modelo de carcinogénesis por múltiples pasos que sigue siendo central en la oncología molecular actual.

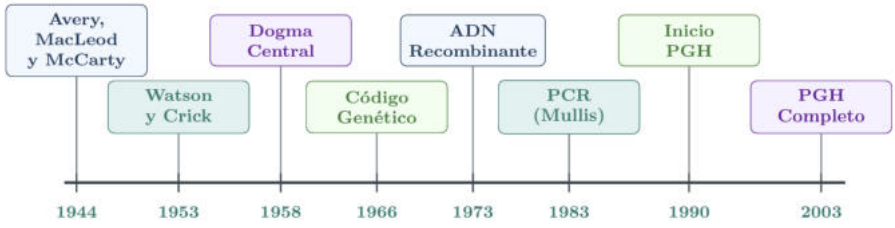


Figura 2. Hitos históricos de la biología molecular (1944–2003).

En menos de seis décadas, la biología molecular transformó la comprensión de la vida a escala molecular. Elaboración propia basada en Lewin et al. (2022) y Watson et al. (2014).

Tabla 2. Hitos principales en la historia de la biología molecular.

Año	Evento	Significado
1866	Leyes de Mendel	Fundamento de la genética formal
1869	Aislamiento de la «nucleína» (Miescher)	Primera identificación del ADN
1944	Experimento de Avery, MacLeod y McCarty	ADN como material genético
1953	Estructura de doble hélice (Watson y Crick)	Modelo molecular de la herencia
1958	Replicación semiconservativa (Meselson y Stahl)	Confirmación experimental del mecanismo
1958/1970	Dogma central (Crick)	Marco organizador del flujo de información
1961	Modelo del operón (Jacob y Monod)	Regulación coordinada de la expresión génica
1966	Desciframiento del código genético	Traducción del lenguaje molecular
1973	ADN recombinante (Cohen y Boyer)	Ingeniería genética
1977	Secuenciación por terminación de cadena (Sanger)	Lectura directa del ADN
1983	PCR (Mullis)	Amplificación específica in vitro
1990–2003	Proyecto Genoma Humano	Secuencia completa del genoma humano
2012	CRISPR-Cas9 como herramienta de edición génica	Edición genómica de precisión

Fuente: Watson et al. (2014), Lewin et al. (2022) y Strachan & Read (2019).

1.5 El dogma central de la biología molecular

El dogma central, formulado por Crick (1970), postula que la información genética fluye en una dirección predominante:

ADN replicación ⟶ *ADN* *ADN* transcripción ⟶ *ARN* traducción ⟶ proteína

Los tres procesos fundamentales son:

1. **Replicación**: el ADN se duplica de forma semiconservativa antes de la división celular, garantizando que cada célula hija reciba una copia fiel del genoma. La replicación requiere la acción coordinada de helicasas (apertura de la doble hélice), topoisomerasas (alivio de la tensión), primasa (síntesis del ARN cebador), ADN polimerasa (síntesis 5'→3'), y ligasa (sellado de nick). En eucariotas, la ADN polimerasa δ sintetiza la cadena retrasada y la ε la cadena continua (Alberts et al., 2022).

2. **Transcripción**: la secuencia de ADN se «lee» por la ARN polimerasa II (en eucariotas) para sintetizar un ARN mensajero (ARNm) en dirección 5'→3'. El molde se lee 3'→5'. En eucariotas, el ARNm primario es procesado (adición del 5'-cap, poliadenilación 3', splicing de intrones) antes de exportarse al citoplasma para su traducción.

3. **Traducción**: el ARNm es leído por los ribosomas —en tripletes de bases (codones)— para sintetizar una cadena polipeptídica cuya

secuencia de aminoácidos está determinada por la secuencia de codones (Alberts et al., 2022). Los ARN de transferencia (ARNt), cargados con su aminoácido específico por las aminoacilARNt sintetasas, actúan como adaptadores entre el lenguaje nucleotídico del ARN y el lenguaje aminoacídico de las proteínas.

Desde una perspectiva de biología celular, los tres procesos del dogma central están compartimentalizados en eucariotas: la replicación y la transcripción ocurren en el núcleo, mientras que la traducción ocurre en los ribosomas del citoplasma. Esta separación espacial tiene consecuencias regulatorias importantes: el ARNm eucariota debe

ser procesado y exportado al citoplasma antes de ser traducido, lo que proporciona múltiples puntos adicionales de regulación postranscripcional (Lodish et al., 2021). En procariotas, en cambio, transcripción y traducción son procesos acoplados que ocurren simultáneamente en el citoplasma, sin compartimentalización nuclear.

Es fundamental no confundir el dogma central con una «ley de la naturaleza» invariable. El propio Crick lo presentó como un enunciado sobre los flujos de información que *generalmente* ocurren, y distinguió entre «flujos generales» (posibles en la naturaleza), «flujos especiales» (posibles solo en condiciones específicas) y «flujos desconocidos» (nunca observados). Esta distinción sutil ha sido malinterpretada repetidamente en la literatura popular, generando la falsa idea de que cualquier excepción «viola» el dogma central (Crick, 1970).

Crick también estableció qué flujos de información son posibles y cuáles no. El descubrimiento de la **transcriptasa inversa** en los

retrovirus (Temin y Baltimore, 1970, Premio Nobel 1975) mostró que el flujo también puede ocurrir de ARN a ADN: los retrovirus —incluido el VIH— utilizan esta enzima para integrar su genoma de ARN en el ADN del huésped (Lewin et al., 2022). Otras excepciones importantes al dogma central incluyen:

Ribozimas: moléculas de ARN con actividad catalítica, que demuestran que el ARN puede actuar tanto como portador de información como catalizador (Premio Nobel Altman y Cech, 1989). Las ribozimas constituyen evidencia del posible «mundo de ARN» primitivo.

Priones: proteínas mal plegadas (PrP^(Sc)) que inducen el mal plegamiento de proteínas normales sin intervención de ácidos nucleicos —un mecanismo proteína→proteína (Premio Nobel Prusiner, 1997) que causó enfermedades como el Creutzfeldt-Jakob.

ARN no codificantes: microARN (miARN), ARN largo no codificante (lncARN), ARN de interferencia (ARNi) y otros que regulan la expresión génica postranscripcionalmente sin ser traducidos a proteína (Bartel, 2004).

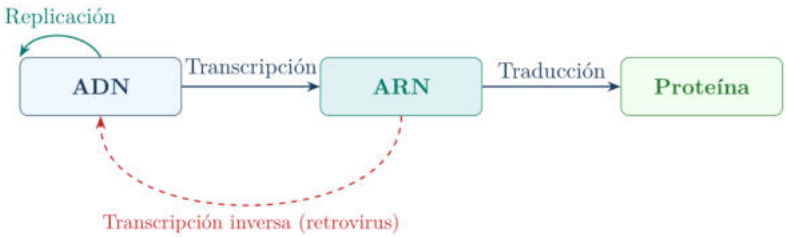


Figura 3. Dogma central de la biología molecular.

Flujos principales de información (flechas sólidas) y el flujo excepcional de la transcripción inversa en retrovirus (flecha discontinua). Elaboración propia basada en Crick (1970).

Concepto Clave

El **dogma central** de la biología molecular establece que la información genética fluye del ADN al ARN y del ARN a la proteína. Las excepciones documentadas (transcripción inversa, ribozimas, priones, ARN no codificantes) no invalidan el

principio general, sino que revelan la complejidad del sistema informacional de la vida. Los tres procesos centrales —replicación, transcripción y traducción— son el eje de toda la biología molecular (Crick, 1970). Una implicación práctica fundamental del dogma central es que los fármacos pueden actuar en cualquiera de los tres pasos: los antibióticos que inhiben la transcripción bacteriana (rifampicina), los que inhiben la traducción (aminoglucósidos, tetraciclinas), los inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa (nrti) en el tratamiento del VIH, y los fármacos de ARNi (*RNA interference*) de nueva generación que silencian genes específicos son

todos ejemplos de intervención farmacológica en el dogma central (Harvey, 2019).

1.6 La biología molecular y el bioquímico farmacéutico

El BQF ocupa una posición estratégica en el sistema de salud: es el profesional que procesa, analiza e interpreta la mayor parte de la información biológica que los médicos utilizan para diagnosticar y tratar enfermedades. La revolución molecular ha ampliado exponencialmente el repertorio de pruebas que el BQF debe dominar (Harvey, 2019).

En Ecuador y en Latinoamérica, el laboratorio molecular clínico se ha desarrollado de manera acelerada en la última década. Hospitales de referencia, laboratorios privados especializados y redes de diagnóstico molecular para enfermedades infecciosas (especialmente impulsadas por la pandemia de covid-19) han creado una demanda sostenida de BQF con formación sólida en biología molecular. Al mismo tiempo, los costos de las tecnologías de secuenciación y análisis molecular siguen bajando, lo que hace previsible que estas herramientas —actualmente disponibles principalmente en centros terciarios— se descentralicen progresivamente hacia laboratorios de nivel secundario e incluso primario. El BQF que se forme hoy en biología molecular estará preparado para liderar esa transición en el sistema de salud de su país (Montes et al., 2016).

1.6.1 Aplicaciones en el laboratorio clínico

Entre las pruebas moleculares que el BQF solicita, realiza o interpreta en el laboratorio clínico moderno se encuentran:

Diagnóstico de enfermedades infecciosas: PCR en tiempo real para la detección de SARS-CoV-2, VIH, hepatitis B y C, *Mycobacterium tuberculosis*, entre otros. La PCR cuantitativa proporciona no solo presencia/ausencia del patógeno, sino la carga viral, dato esencial para monitorear la respuesta al tratamiento antiviral (Bustin et al., 2009).

Diagnóstico genético: detección de mutaciones en enfermedades hereditarias (fibrosis quística, anemia falciforme, fenilcetonuria) y tamizaje neonatal. La secuenciación de *BRCA1*/*BRCA2* para evaluar el riesgo de cáncer hereditario de mama y ovario es uno de los servicios de mayor crecimiento en los laboratorios moleculares actuales (Richards et al., 2015).

Diagnóstico oncológico: identificación de mutaciones somáticas en oncogenes y genes supresores de tumores (*BRCA1/2*, *EGFR*, *KRAS*, *TP53*); biopsia líquida mediante detección de ADN tumoral circulante en plasma (Crowley et al., 2013).

Farmacogenómica: genotipificación de polimorfismos en enzimas metabolizadoras de fármacos (*CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9*) para personalizar la dosificación y prevenir reacciones adversas graves (Relling & Evans, 2015).

Biología de banco de sangre: tipificación molecular del grupo sanguíneo abo y del sistema Rh, especialmente en pacientes

politransfundidos donde la serología convencional puede ser confusa (Nussbaum et al., 2016).

1.6.2 El BQF ante la era molecular: competencias emergentes

La formación en biología molecular dota al BQF de competencias que van más allá de la ejecución de protocolos: le permite *interpretar* los resultados moleculares en su contexto clínico, *validar* la calidad de una prueba molecular, *seleccionar* la técnica más apropiada para cada situación diagnóstica y *asesorar* a otros profesionales de la salud sobre el alcance y las limitaciones de la información genómica (Weinshilboum & Wang, 2017).

Un BQF competente en biología molecular entiende por qué un resultado de PCR puede ser falsamente negativo si la carga viral es inferior al límite de detección, o falsamente positivo si la muestra se contamina con amplicones previos. Entiende también por qué un mismo genotipo de *CYP2D6* puede tener consecuencias clínicas diferentes según si el fármaco en cuestión es activado (profármaco como la codeína) o inactivado por esa enzima.

El horizonte profesional del BQF en el campo de la biología molecular incluye también nuevas modalidades de análisis clínico que se están consolidando rápidamente. La **biopsia líquida** —detección de ADN tumoral circulante, células tumorales circulantes y exosomas en plasma— permite monitorear la carga tumoral de un paciente con cáncer de forma mínimamente invasiva, sin necesidad de biopsia tisular (Crowley et al., 2013).

Los **paneles de farmacogenómica** integran múltiples genes simultáneamente (decenas de genes *CYP*, transportadores, blancos de fármacos) y están comenzando a usarse rutinariamente antes de iniciar tratamientos farmacológicos complejos para prevenir reacciones adversas (Relling & Evans, 2015).

La **secuenciación del ARN** (RNA-seq) de tumores individuales permite identificar fusiones génicas, variantes de splicing y perfiles de expresión que orientan la elección del tratamiento oncológico. Cada una de estas aplicaciones requiere que el BQF entienda los principios moleculares subyacentes para validar, interpretar y reportar los resultados con la calidad que exige la práctica clínica responsable.

1.6.3 Ética y responsabilidad en el manejo de información genómica

La biología molecular pone en manos del BQF un tipo de información especialmente sensible: la información genética del paciente. A diferencia de un resultado de glucosa en ayunas, que describe el estado metabólico presente del paciente, la información genómica

describe el riesgo futuro del paciente y de sus familiares biológicos. Esta característica genera responsabilidades éticas específicas que el profesional del laboratorio molecular debe conocer (Nussbaum et al., 2016).

Los principios fundamentales que rigen el manejo ético de información genómica incluyen: (1) el **consentimiento informado** como condición necesaria antes de cualquier prueba genética predictiva —el paciente debe comprender qué se busca, qué significa un resultado positivo o

negativo, y cuáles son las implicaciones para sus familiares—; (2) la **confidencialidad** de los datos genómicos, que en muchos países está protegida por legislación específica; (3) el **derecho a no saber** —un individuo puede legítimamente optar por no conocer su predisposición genética a una enfermedad para la cual no existe tratamiento preventivo efectivo—; (4) la **no discriminación** basada en información genética en el acceso al empleo o los seguros de salud.

Para el BQF, la dimensión ética de la biología molecular no es una cuestión abstracta: se materializa cada vez que firma un reporte de genotipificación de *BRCA1/2*, interpreta un resultado de diagnóstico prenatal o comunica a un médico una variante patogénica detectada en un estudio genómico. La formación ética en genómica es tan importante como la formación técnica (Richards et al., 2015).

1.6.4 Bioinformática: el puente entre la biología molecular y el laboratorio clínico

El análisis de datos moleculares generados por las tecnologías modernas —especialmente la NGS— requiere herramientas bioinformáticas que el BQF debe conocer al menos conceptualmente. La bioinformática no es una disciplina separada de la biología molecular: es su extensión natural al dominio computacional (Mardis, 2011).

Los pasos básicos del análisis bioinformático de datos de NGS incluyen: (1) control de calidad de las lecturas crudas (filtrado por calidad de base); (2) alineamiento de las lecturas contra el genoma de referencia; (3) llamado de variantes (*variant calling*); (4) anotación

funcional de las variantes (bases de datos ClinVar, OMIM, gnomAD); y (5) interpretación clínica según los criterios estandarizados de Richards et al. (2015).

El BQF no necesita programar estos análisis, pero sí necesita entender qué representan los parámetros de calidad del reporte (profundidad de cobertura, frecuencia alélica, calidad de la variante) para evaluar la confiabilidad del resultado.

Las bases de datos de variantes genéticas son herramientas indispensables para el trabajo molecular clínico. ClinVar (variantes y enfermedades), OMIM (genes y fenotipos mendelianos), gnomAD (frecuencias alélicas en poblaciones de referencia), PharmGKB (farmacogenómica) y COSMIC (variantes somáticas en cáncer) son recursos que el BQF debe conocer para interpretar los reportes moleculares en su contexto poblacional y clínico (Strachan & Read, 2019).

Un resultado de secuenciación que identifica una variante de un solo nucleótido (snv) en el gen *BRCA1* solo puede interpretarse correctamente consultando estas bases de datos: ¿con qué frecuencia aparece esa variante en poblaciones sanas (gnomAD)? ¿Hay reportes previos que la asocien con cáncer hereditario (ClinVar)? ¿La variante está en un dominio funcional crítico de la proteína (Ensembl)? Sin este contexto bioinformático, la variante es solo una secuencia; con él, se convierte en información clínica accionable.

Esta integración de tecnología molecular y bioinformática es la competencia distintiva del laboratorio molecular moderno y una razón

más por la cual la formación en biología molecular es indispensable para el BQF del siglo XXI (Richards et al., 2015).

Más allá del diagnóstico, la bioinformática también juega un papel central en la investigación de nuevos biomarcadores, en el diseño de terapias génicas y en la comprensión de la farmacogenómica a escala de todo el genoma (*genome-wide pharmacogenomics*). Para el BQF que desee especializarse en biología molecular avanzada, el dominio de herramientas bioinformáticas básicas —visualizadores de secuencias como IGV, bases de datos de variantes, algoritmos de llamado de variantes— es una competencia diferenciadora de alto valor en el mercado laboral (Mardis, 2011).

Aplicación para el Bioquímico Farmacéutico

En un laboratorio clínico moderno, el BQF puede encontrarse:

Ajustando el umbral de ciclo (*Ct*) de una prueba de PCR cuantitativa para optimizar la sensibilidad diagnóstica de la detección viral. Interpretando un reporte de genotipificación de *CYP2D6* para recomendar al médico si un paciente es metabolizador lento o ultrarrápido de codeína, con las implicaciones de analgesia insuficiente o toxicidad opioide. Validando la integridad del ADN extraído de una muestra de sangre periférica (relación A260/A280) antes de enviarlo para secuenciación genómica.

Revisando los controles internos de una prueba de hibridación in situ fluorescente (FISH) para confirmar la ausencia de amplificación del oncogén *HER2*.

Comunicando a un médico qué significa una «variante de significado incierto» (vus) en el reporte de secuenciación de un paciente con antecedentes familiares de cáncer.

En todos estos escenarios, la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes es indispensable para ejercer con criterio científico (Harvey, 2019).

En el Laboratorio

Protocolo: Extracción de ADN de sangre periférica (método de columna de sílice) Principio: El ADN se une selectivamente a membranas de sílice en condiciones de alta concentración de sales caotrópicas (guanidinio), mientras que proteínas y otros contaminantes se eliminan por lavado.

Materiales: Sangre total en edta (3 mL), kit comercial de extracción (columna de sílice), tampón de lisis, tampón de lavado, tampón de elución, microcentrífuga, baño seco a 56 ^(◦)C.

Pasos principales:

1. Lisado de células mediante tampón caotrópico + proteinasa K (56 ºC, 15 min): degradación de proteínas e inactivación de nucleasas endógenas.

2. Unión del ADN a la columna de sílice por centrifugación (8 000 × *g*, 1 min).

3. Lavados sucesivos para eliminar impurezas (etanol al 70 %, 2 lavados).

4. Elución del ADN purificado con tampón bajo en sales (65 ^(◦)C, 1 min) o agua libre de nucleasas.

Control de calidad: Medición de absorbancia a 260/280 nm (relación ideal 1.8–2.0 para ADN libre de proteínas) y a 260/230 nm (relación ideal 2.0–2.2, sensible a contaminantes como guanidinio o fenol).

Relevancia para el BQF: La calidad del ADN extraído determina directamente el éxito de los análisis moleculares posteriores (PCR, secuenciación, FISH). Un ADN degradado o con inhibidores puede generar resultados falsos negativos en PCR clínica, con consecuencias diagnósticas y terapéuticas directas.

Tabla 3. Campos de aplicación de la biología molecular en Bioquímica y Farmacia.

Campo	Técnica molecular	Ejemplo clínico
Diagnóstico infeccioso	PCR, RT-PCR, qPCR	Detección de SARS-CoV-2, VIH, VHC
Diagnóstico genético	NGS, PCR alelo-específica	Fibrosis quística (CFTR), anemia falciforme
Oncología molecular	NGS, FISH, qPCR	Mutación EGFR en cáncer de pulmón
Farmacogenómica	Genotipificación CYP	Warfarina, clopidogrel, codeína
Banco de sangre	Tipificación molecular	Grupos sanguíneos raros
Biofármacos	ADN recombinante	Insulina, eritropoyetina, anticuerpos monoclonales
Diagnóstico prenatal	PCR, FISH, CGH array	Trisomía 21, mutaciones BRCA

Fuente: Harvey (2019), Relling & Evans (2015) y Weinshilboum & Wang (2017).

Caso Clínico

Situación: En un laboratorio de biología molecular de un hospital, una paciente de 45 años con diagnóstico reciente de cáncer de mama tiene indicada una prueba de genotipificación de *BRCA1* y *BRCA2*. El médico solicita la prueba y pregunta cuánto tiempo tomará el resultado. El BQF responsable debe: (a) explicar al médico qué técnica se utilizará (NGS), (b) aclarar que el tiempo de respuesta incluye extracción de ADN, amplificación de los exones de ambos genes, secuenciación, análisis bioinformático básico y validación del reporte, y (c) orientar sobre el tipo de variantes que la prueba puede y no puede detectar (variantes de secuencia sí; grandes reordenamientos genómicos requieren técnica complementaria de mlpa).

Contexto: La paciente tiene antecedentes familiares de cáncer de ovario en madre y tía materna, perfil sugestivo de síndrome hereditario de cáncer de mama y ovario (hboc), donde mutaciones en *BRCA1*/*BRCA2* explican el 20–25 % de los casos.

Preguntas para el análisis:

(1) ¿Qué conocimientos de biología molecular necesita el BQF para cumplir adecuadamente con cada uno de estos roles?

(2) ¿Por qué es importante especificar en el reporte si una variante es patogénica, benigna o VUS?

(3) ¿Qué implicaciones clínicas y éticas tiene un resultado positivo para la paciente y su familia?

1.7 Herramientas tecnológicas de la biología molecular: una panorámica

Antes de adentrarse en los mecanismos moleculares que se desarrollan en los capítulos siguientes, es útil tener una visión panorámica de las principales herramientas tecno-

lógicas que la biología molecular ha generado y que el BQF encontrará tanto en la literatura científica como en el laboratorio clínico. Estas herramientas son el puente entre el conocimiento teórico y la práctica diagnóstica y farmacéutica.

1.7.1 Técnicas de amplificación y detección de ácidos nucleicos

La **PCR** (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es la técnica más ubicua del laboratorio molecular moderno. En su versión cuantitativa en tiempo real (qPCR o RT-qPCR), permite detectar y cuantificar ácidos nucleicos con sensibilidad de pocas copias por reacción (Bustin et al., 2009). Sus variantes incluyen la PCR de punto final (presencia/ausencia), la PCR cuantitativa en tiempo real (carga viral, expresión génica), la PCR multiplex (detección simultánea de múltiples dianas), la PCR digital (cuantificación absoluta sin curva estándar) y la RT-PCR (amplificación a partir de ARN mediante retrotranscripción previa).

El **análisis de fragmentos** (electroforesis capilar) y las técnicas de **hibridación** —Southern blot, Northern blot, hibridación in situ

fluorescente (FISH)— complementan la PCR para el análisis de tamaños, expresión tisular y localización cromosómica de secuencias génicas específicas (Alberts et al., 2022).

1.7.2 Secuenciación del ADN

La secuenciación de Sanger et al. (1977) por terminación de cadena con didesoxinucleótidos (secuenciación «de primera generación») fue la tecnología dominante durante décadas y sigue siendo el estándar de oro para la confirmación de variantes puntuales en contexto clínico. Sin embargo, la **secuenciación de nueva generación** (NGS) ha transformado el campo al permitir secuenciar en paralelo millones de fragmentos de ADN simultáneamente (Metzker, 2010). Las plataformas de NGS (Illumina, Ion Torrent, Oxford Nanopore) ofrecen diferentes balances de rendimiento, longitud de lectura y costo, y su selección depende de la aplicación clínica específica.

Para el BQF, las aplicaciones más relevantes de la secuenciación incluyen: secuenciación de exoma completo (wes), secuenciación de paneles génicos dirigidos para enfermedades hereditarias, secuenciación de ARN (RNA-seq) para análisis de expresión génica, y análisis de ADN tumoral circulante en biopsia líquida (Crowley et al., 2013).

1.7.3 Edición genómica: CRISPR-Cas9

El sistema CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) representa la revolución tecnológica más reciente en biología molecular. Descrito en 2012 por Jinek et al. (2012)

y desarrollado como herramienta de edición genómica programable, permite introducir cortes de doble cadena en el ADN en posiciones específicas guiadas por un ARN de guía (sgrna). Dependiendo del mecanismo de reparación del corte (unión de extremos no homólogos —nhej— o recombinación homóloga —hr—), es posible inactivar genes, corregir mutaciones o insertar secuencias específicas (Alberts et al., 2022).

Las implicaciones farmacéuticas y diagnósticas de CRISPR son múltiples: desde la generación de modelos celulares y animales de enfermedad hasta las primeras terapias génicas aprobadas (anemia falciforme, beta-talasemia). Para el BQF, entender el mecanismo de CRISPR es requisito para comprender los reportes de seguridad y eficacia de los ensayos clínicos en curso y los productos de terapia génica en desarrollo.

Tabla 4. Comparación de las principales tecnologías de secuenciación en uso clínico

Tecnología	**Longitud de lectura**	**Aplicación clínica**	**Limitación**
Sanger (1.ª gen.)	≈800 pb	Confirmación de variantes	Baja escala
NGS (Illumina)	150–300 pb	Paneles génicos, exoma	Lecturas cortas
Ion Torrent	200–400 pb	Paneles oncológicos	Errores en homopolímeros
Nanopore	>10 kpb	Variantes estructurales	Mayor tasa de error

Fuente: Metzker (2010) y Mardis (2011).

Nota. pb = pares de bases; kpb = kilopares de bases.

1.7.4 Perspectivas emergentes: hacia la biología molecular de precisión

La biología molecular del siglo XXI se orienta hacia la medicina de precisión: el uso de la información molecular individual del paciente para optimizar la prevención, el diagnóstico y el tratamiento. Este paradigma se apoya en cuatro pilares tecnológicos convergentes: la genómica (secuenciación del genoma), la transcriptómica (análisis masivo de la expresión génica por RNA-seq), la proteómica (análisis masivo del conjunto de proteínas de una célula o tejido) y la metabolómica (análisis del conjunto de metabolitos) (Collins et al., 2003).

Para el BQF, estas tecnologías «-ómicas» generan oportunidades profesionales sin precedentes, pero también demandas de formación permanente. El laboratorio de biología molecular de precisión del futuro cercano operará con paneles genómicos de miles de genes, con análisis de ARN de célula única (*single-cell RNA-seq*) para caracterizar la heterogeneidad tumoral, y con plataformas de diagnóstico molecular portátiles basadas en CRISPR. La base conceptual de todo esto es exactamente lo que se desarrolla en este texto: el dogma central, la estructura de los ácidos nucleicos, los mecanismos de expresión génica, la genética molecular de las enfermedades y las herramientas de biología molecular, como resume Metzker (2010).

El estudiante de Bioquímica y Farmacia que comprende profundamente la biología molecular estará en condiciones no solo de

ejecutar las tecnologías actuales, sino de adaptarse a las del futuro, porque lo que cambia son los instrumentos, no los principios. La hélice del ADN sigue siendo antiparalela, el código genético sigue siendo (casi) universal, y la información sigue fluyendo en la dirección que Crick describió hace más de seis décadas. Dominar ese conocimiento es dominar el lenguaje de la vida (Alberts et al., 2022).

El capítulo 1 ha establecido el marco histórico y conceptual de la biología molecular. El capítulo 2 profundizará en las macromoléculas informacionales —ADN, ARN y proteínas— cuya estructura determina sus funciones en el dogma central.

Conceptos Clave

Biología molecular

Disciplina que estudia los mecanismos moleculares subyacentes a los procesos biológicos, con énfasis en las macromoléculas portadoras de información genética (ADN, ARN, proteínas) y sus interacciones.

Dogma central

Principio formulado por Crick que establece el flujo predominante de información genética: ADN →ARN →proteína, con excepciones documentadas (transcripción inversa, ribozimas, priones).

Gen

Unidad funcional de la herencia; secuencia de ADN que codifica una molécula de ARN o una proteína funcional. El genoma humano contiene ≈20.000–25.000 genes codificantes de proteínas.

Genoma

Conjunto completo del material genético de un organismo, incluyendo genes codificantes (≈1.5 % en humanos) y las vastas regiones no codificantes.

Replicación semiconservativa

Mecanismo de duplicación del ADN en que cada cadena progenitora sirve de molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria; confirmada por Meselson y Stahl (1958).

Transcripción

Proceso mediante el cual la ARN polimerasa sintetiza una molécula de ARN a partir de una cadena molde de ADN, siguiendo la dirección 5'→3'.

Traducción

Proceso mediante el cual los ribosomas leen el ARNm en tripletes (codones) para sintetizar una cadena polipeptídica.

PCR

Reacción en Cadena de la Polimerasa; técnica de amplificación in vitro de fragmentos específicos de ADN mediante ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación y síntesis por ADN polimerasa termoestable.

Farmacogenómica

Campo que estudia cómo las variaciones genéticas individuales influyen en la respuesta a los fármacos, con aplicación directa en la dosificación personalizada.

Transcriptasa inversa

Enzima retroviral que sintetiza ADN a partir de un molde de ARN; representa un flujo excepcional al dogma central y es diana farmacológica en el tratamiento del VIH.

Proyecto Genoma Humano

Esfuerzo internacional (1990–2003) que secuenció el genoma humano haploide completo ($3{,}2 \times 10^9$ pb), revelando ≈20.000–25.000 genes codificantes de proteínas.

Resultado de la colaboración de miles de científicos en más de 20 países y publicado simultáneamente por el consorcio público (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) y Celera Genomics (Venter et al., 2001).

Inhibidor de transcriptasa inversa

Fármaco que bloquea la actividad de la transcriptasa inversa retroviral, impidiendo la síntesis de ADN a partir del ARN viral. Clase farmacológica central en el tratamiento del VIH (p.ej., zidovudina, tenofovir). Ejemplo directo de farmacología con base en el dogma central.

Polimorfismo de nucleótido único (SNP)

Variación en un solo nucleótido del ADN que ocurre en una frecuencia ≥1 % en la población. Los SNPs son la base de los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) y de los análisis de farmacogenómica; existen ≈10 millones de SNPs comunes en el genoma humano.

CRISPR-Cas9

Sistema de edición genómica de precisión derivado de la inmunidad adaptativa bacteriana, que permite cortar el ADN en sitios específicos guiados por una secuencia de ARN guía. Fue desarrollado como herramienta biotecnológica por Jinek et al. (2012), lo que llevó al Premio Nobel de Química 2020 a Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier.

Código genético

Conjunto de reglas que define la correspondencia entre los 64 codones del ARNm y los 20 aminoácidos del código estándar. Es degenerado (varios codones pueden especificar el mismo aminoácido), sin solapamiento, sin comas (es decir, se lee en fase continua) y casi universal, con excepciones menores en mitocondrias y algunos protistas.

Organismo modelo

Organismo cuyas características biológicas lo hacen especialmente útil para investigación molecular: ciclo de vida corto, genoma pequeño o bien caracterizado, y fácil manipulación genética. Ejemplos clave: *E. coli* (replicación, transcripción, antibióticos), *S. cerevisiae* (ciclo

celular, respuesta a daño en el ADN), *C. elegans* (apoptosis, ARNi), *D. melanogaster* (genética del desarrollo), *M. musculus* (modelos de enfermedades humanas).

Inmunohistoquímica molecular

Técnica que combina reacciones inmunológicas (anticuerpos específicos) con análisis molecular para detectar proteínas in situ en tejidos; especialmente relevante en diagnóstico oncológico para determinar el perfil molecular de expresión tumoral (receptor de estrógeno, HER2, Ki-67).

Replicación de origen (ori)

Secuencia específica del ADN donde se inicia la replicación. Los organismos procariotas tienen un solo ori; los cromosomas eucariotas tienen múltiples oris que se activan coordinadamente para replicar el genoma completo en tiempos razonables.

Síntesis semiconservativa

Modo de replicación del ADN en que cada molécula hija contiene una cadena original (progenitora) y una nueva (recién sintetizada), demostrado experimentalmente por Meselson y Stahl (1958). Se distingue de la síntesis conservativa (ambas cadenas progenitoras en la molécula original) y dispersiva (mezcla aleatoria).

ARN no codificante

Cualquier molécula de ARN que no es traducida a proteína: ARNt, ARNr, snARN, snoARN, microARN, lncRNA, ARNi, etc.

Representan la gran mayoría del ARN celular y tienen funciones reguladoras, estructurales y catalíticas esenciales.

Exoma

Conjunto de todos los exones del genoma; representa el ≈1 % del genoma humano pero contiene el ≈85 % de las variantes asociadas a enfermedades mendelianas. La secuenciación del exoma completo (WES) es una herramienta diagnóstica de alta eficacia en enfermedades raras.

Consentimiento informado genético

Proceso mediante el cual un paciente es informado sobre la naturaleza, objetivos, alcances, limitaciones e implicaciones de una prueba genética antes de autorizar su realización. Es un requisito ético y legal para toda prueba genética predictiva.

Transcriptómica

Análisis masivo del conjunto de ARN expresados por una célula, tejido u organismo en un momento determinado (ARN total o subpoblaciones específicas). La tecnología principal es el RNA-seq (NGS aplicado a ARN).

Proteómica

Campo que estudia el conjunto completo de proteínas (proteoma) expresadas por una célula, tejido u organismo. Se basa principalmente en espectrometría de masas. Complementa a la genómica al revelar el estado funcional real de la célula.

Medicina de precisión

Modelo de atención médica que utiliza información genómica, proteómica, metabolómica y clínica de cada individuo para personalizar la prevención, el diagnóstico y el tratamiento. El BQF es actor clave en la generación de datos moleculares que alimentan este modelo.

Biopsia líquida

Técnica de diagnóstico molecular que detecta componentes derivados de tumores (ADN tumoral circulante, células tumorales circulantes) en sangre u otros líquidos biológicos, permitiendo monitorear la evolución del cáncer de forma mínimamente invasiva.

Exón

Segmento de un gen que es retenido en el ARNm maduro después del splicing y es potencialmente codificante de proteína. Contrasta con el intrón, que es eliminado durante el procesamiento del ARNm.

Intrón

Segmento de un gen transcrito en el ARNm precursor pero eliminado durante el splicing. Representa la mayor parte de la longitud de los genes eucariotas. Aunque inicialmente considerado «ADN basura» (término actualmente desaconsejado), los intrones contienen numerosos elementos reguladores y pueden dar origen a ARN no codificantes funcionales.

Promotor

Región del ADN localizada upstream (5') del gen que sirve de sitio de unión para la ARN polimerasa y los factores de transcripción generales, iniciando así la transcripción. La secuencia y los elementos del promotor determinan en gran medida cuándo, dónde y cuánto se transcribe un gen.

Factor de transcripción

Proteína que se une a secuencias específicas del ADN (elementos reguladores) para activar o reprimir la transcripción de genes diana. Muchos oncogenes y genes supresores de tumores codifican factores de transcripción cuya desregulación contribuye al desarrollo del cáncer.

Southern blot

Técnica clásica de diagnóstico molecular que permite detectar secuencias específicas de ADN mediante hibridación con sondas marcadas tras separación electroforética y transferencia a membrana. Desarrollada por Southern (1975), fue la base de los primeros diagnósticos moleculares de enfermedades genéticas.

Telómero

Secuencia repetida de ADN (TTAGGG en humanos) que protege los extremos de los cromosomas eucariotas del deterioro durante la replicación. La enzima telomerasa mantiene la longitud telomérica en células germinales y tumores; su activación es un hallazgo diagnóstico de importancia en oncología molecular.

Epigenética

Conjunto de cambios heredables en la expresión génica que no implican cambios en la secuencia del ADN, incluyendo metilación del ADN en posiciones CpG y modificaciones covalentes de histonas. Conecta el ambiente y el estilo de vida con la expresión génica, y tiene importancia creciente en el diagnóstico y tratamiento del cáncer (Bird, 2002).

Mutación

Cambio permanente en la secuencia de nucleótidos del ADN que puede ser espontáneo (errores de replicación) o inducido (mutágenos físicos como radiación ionizante o químicos como el benzo[a]pireno). Se distingue del polimorfismo por su frecuencia en la población (<1 % para mutaciones raras) y por sus consecuencias funcionales generalmente patológicas. Los tipos incluyen sustituciones (missense, nonsense, sinónimas), deleciones, inserciones y mutaciones de cambio de marco de lectura.

Hibridación in situ fluorescente (FISH)

Técnica de diagnóstico molecular que utiliza sondas de ADN marcadas con fluoróforos para detectar secuencias génicas específicas directamente en cromosomas o células. Permite identificar amplificaciones génicas (p. ej., HER2 en cáncer de mama), deleciones cromosómicas y translocaciones en el laboratorio de citogenética molecular (Pinkel et al., 1986).

Actividades de Consolidación

Actividad 1. Línea de tiempo colaborativa. En grupos de tres estudiantes, construyan una línea de tiempo visual con los hitos principales de la historia de la biología molecular mencionados en este capítulo. Para cada hito, identifiquen: año, científicos involucrados, concepto o técnica clave, relevancia para la práctica del BQF y Premio Nobel asociado (si corresponde). Discutan: ¿qué hito consideran más transformador para el laboratorio clínico actual?

Actividad 2. Análisis de caso profesional. A partir del caso clínico de la sección 1.4, respondan por escrito:

(a) liste los conocimientos de biología molecular que el BQF necesita para cumplir su rol en ese escenario;

(b) identifique tres preguntas que el BQF podría hacer al médico para clarificar el contexto clínico;

(c) explique por qué la distinción entre variante patogénica, benigna y VUS tiene consecuencias clínicas y éticas relevantes.

Actividad 3. Mapa conceptual del dogma central. Elaboren un mapa conceptual que integre: dogma central, replicación, transcripción, traducción, código genético, ARNm, ribosoma y proteína. Incluyan al menos dos excepciones (retrovirus, ribozimas, priones, ARN no codificantes).

Actividad 4. Debate de roles. Dividan la clase en dos grupos: uno argumenta que «el BQF necesita biología molecular principalmente

para ejecutar protocolos»; el otro argumenta que «el BQF necesita biología molecular principalmente para interpretar y validar resultados». Elaboren una conclusión consensuada tras 15 minutos de debate.

Actividad 5. Evaluación crítica de un reporte molecular. El docente proporcionará un reporte de PCR clínica (anónimo). Los estudiantes identificarán:

(a) el tipo de técnica utilizada;

(b) los controles incluidos y su función;

(c) el significado del resultado en el contexto clínico;

(d) las limitaciones de la prueba.

Actividad 6. Consulta de bases de datos moleculares. Acceda a las bases de datos ClinVar (clinvar.ncbi.nlm.nih.gov) y OMIM (omim.org). Busque el gen *CFTR* (fibrosis quística):

(a) ¿Cuántas variantes patogénicas están registradas?

(b) ¿Cuáles son las más frecuentes en la población latinoamericana?

(c) ¿Qué tipo de prueba molecular se utiliza para la detección de la variante más común (*c.1521_1523delCTT*, p.Phe508del) en el laboratorio clínico?

(d) ¿Cuál sería el resultado de la prueba en un portador heterocigoto comparado con un paciente homocigoto? Elabore un informe de media

página con sus hallazgos y discuta en clase las implicaciones para el tamizaje neonatal en su país.

Actividad 7. Historia oral de la biología molecular. Busque en internet una entrevista o conferencia de al menos uno de los científicos mencionados en este capítulo (Francis Crick, James Watson, Kary Mullis, Jennifer Doudna, o equivalente). Prepare un resumen de 300 palabras sobre:

(a) el contexto histórico en que realizó su descubrimiento;

(b) los obstáculos que enfrentó;

(c) el impacto de su trabajo en el laboratorio clínico actual;

(d) las implicaciones éticas de su contribución.

1.8 Preguntas de Autoevaluación

A. Opción múltiple

1. ¿Cuál de los siguientes experimentos demostró de forma concluyente que el ADN —y no las proteínas— es el material genético?

(a) El experimento de Griffith (1928) con neumococos

(b) **El experimento de Avery, MacLeod y McCarty (1944)**

(c) El experimento de Morgan con *Drosophila*

(d) La difracción de rayos X de Franklin (1952)

2. El dogma central de la biología molecular establece que:

(a) La información fluye de proteína a ARN a ADN

(b) Las proteínas pueden replicarse directamente

(c) **La información fluye de ADN a ARN a proteína, con excepciones documentadas**

(d) El ARN es siempre el primer paso en la síntesis de cualquier macromolécula

3. La PCR fue desarrollada por Kary Mullis en:

(a) 1953

(b) 1977

(c) **1983**

(d) 1990

4. ¿Cuál de los siguientes es un ejemplo directo de aplicación de la biología molecular en el laboratorio del BQF?

(a) Medición de glucosa por espectrofotometría

(b) Tinción de Gram para identificación bacteriana

(c) **Detección de SARS-CoV-2 mediante qPCR**

(d) Conteo celular en hemograma automatizado

5. La transcriptasa inversa es característica de:

(a) Las bacterias gram-positivas

(b) Los hongos patógenos

(c) **Los retrovirus como el VIH**

(d) Los priones

6. El Proyecto Genoma Humano determinó que el número aproximado de genes

codificantes de proteínas en el genoma humano es:

(a) 3.2 millones

(b) 100.000

(c) **20.000–25.000**

(d) 500.000

7. ¿Qué proceso convierte la información del ARNm en una secuencia de aminoácidos?

(a) Transcripción

(b) Replicación

(c) **Traducción**

(d) Transducción

8. La farmacogenómica se define como:

(a) El estudio de cómo los fármacos afectan al genoma

(b) La síntesis de medicamentos usando técnicas de ADN recombinante

(c) **El estudio de cómo las variaciones genéticas individuales influyen en la respuesta a los fármacos**

(d) El uso de genómica para diseñar vacunas

9. ¿Qué experimento confirmó en 1958 el mecanismo de replicación semiconservativa del ADN?

(a) El experimento de Hershey y Chase

(b) La cristalografía de rayos X de Franklin

(c) **El experimento de Meselson y Stahl con ^{15}N y centrifugación en CsCl**

(d) La clonación molecular de Cohen y Boyer

10. CRISPR-Cas9 es una herramienta de:

(a) Secuenciación masiva paralela

(b) Amplificación de ácidos nucleicos

(c) Hibridación fluorescente in situ

(d) **Edición genómica de precisión guiada por ARN**

B. Preguntas de desarrollo

1. Explica con tus propias palabras por qué el dogma central se considera un «marco organizador» de la biología molecular más que una ley absoluta. Menciona al menos dos situaciones que lo complementan o excepcionan, y explica por qué estas excepciones son clínicamente relevantes.

2. Describe el impacto del descubrimiento de la estructura del ADN (Watson y Crick, 1953) sobre la comprensión del mecanismo de la herencia. ¿Por qué la estructura de doble hélice «explicaba de inmediato» la replicación? ¿Qué experimento posterior confirmó ese mecanismo y cómo funcionó?

3. Un estudiante de primer año pregunta: «¿Para qué necesito saber biología molecular si quiero trabajar en un banco de sangre?» Elabora una respuesta argumentada de al menos tres párrafos, incluyendo al menos dos ejemplos concretos de aplicación molecular en ese contexto.

4. La distinción entre procariotas y eucariotas es fundamental en biología molecular.

(a) Liste cinco diferencias moleculares clave entre los sistemas de expresión génica procariota y eucariota.

(b) Explica por qué el acoplamiento transcripciónтraducción en procariotas es posible y por qué no ocurre en eucariotas.

(c) ¿Qué implicaciones tiene esta distinción para el diseño de antibióticos que bloqueen la síntesis proteica bacteriana sin afectar la del huésped humano?

5. Define el concepto de «organismo modelo» en biología molecular.

(a) ¿Qué características hacen que un organismo sea útil como modelo experimental?

(b) ¿Por qué los hallazgos obtenidos en *E. coli* o levadura son relevantes para la biología molecular humana?

(c) Menciona una limitación importante de extrapolar directamente los mecanismos moleculares de procariotas a eucariotas.

1.9 Glosario

ADN (Ácido Desoxirribonucleico)

Macromolécula portadora de la información genética; formada por dos cadenas antiparalelas de nucleótidos unidas por puentes de hidrógeno entre bases complementarias (A-T, G-C). El genoma humano haploide tiene $\approx 3{,}2 \times 10^9$ pb.

ARN (Ácido Ribonucleico)

Macromolécula de cadena sencilla que interviene en la transferencia y expresión de la información genética; existe en diversas formas funcionales (ARNm, ARNt, ARNr, microARN, lncRNA).

Codón

Triplete de bases en el ARNm que especifica un aminoácido o una señal de inicio/terminación de la traducción. El genoma humano usa 61 codones senso y 3 codones de terminación.

Cromosoma

Estructura de ADN asociado a proteínas histonas que organiza y compacta el material genético. El genoma humano diploide tiene 46 cromosomas (23 pares).

Enzima de restricción

Endonucleasa bacteriana que corta el ADN en secuencias específicas (sitios de restricción); herramienta fundamental del ADN recombinante.

Genómica

Campo que estudia el genoma completo de un organismo, incluyendo la secuencia, estructura, función y evolución de todos sus genes y regiones no codificantes.

Nucleótido

Unidad monomérica del ADN y el ARN, compuesta por una base nitrogenada, un azúcar (desoxirribosa en ADN, ribosa en ARN) y uno o más grupos fosfato.

Operón

Unidad de expresión génica en procariotas compuesta por genes estructurales bajo el control de un operador y promotor comunes; modelo propuesto por Jacob y Monod (1961).

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Amplifica exponencialmente un fragmento específico de ADN mediante ciclos sucesivos de desnaturalización, hibridación de cebadores y síntesis por ADN polimerasa termoestable.

Prión

Proteína con configuración patológica (PrP^(Sc)) capaz de inducir el mal plegamiento de la proteína celular normal (PrP^(C)), sin intervención de ácidos nucleicos; agente causal de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

Proteína

Polímero de aminoácidos que realiza la mayoría de las funciones biológicas de la célula; su secuencia de aminoácidos está determinada por la información del ADN y su función por su estructura tridimensional.

Retrovirus

Virus de ARN que utiliza la transcriptasa inversa para convertir su genoma en ADN e integrarlo en el genoma del huésped; ejemplo clínico paradigmático: el VIH.

Secuenciación de nueva generación (NGS)

Tecnologías que permiten secuenciar millones de fragmentos de ADN en paralelo a bajo costo y con alta cobertura; base del diagnóstico molecular moderno.

Variante de significado incierto (VUS)

Cambio en la secuencia del ADN para el que la evidencia disponible no permite clasificar de forma concluyente como patogénico o benigno; requiere seguimiento y actualización conforme avanza el conocimiento.

Ribozima

Molécula de ARN con actividad catalítica; demostraron que el ARN puede actuar tanto como portador de información como enzima, evidencia del posible «mundo de ARN» primitivo. Ejemplo: el ribosoma es, en su componente catalítico, una ribozima.

Splicing (empalme)

Proceso de procesamiento del ARNm precursor en eucariotas mediante el cual los intrones son eliminados y los exones son unidos para formar el ARNm maduro. El splicing alternativo permite generar múltiples proteínas distintas a partir de un solo gen.

Oncogén

Gen cuya activación o sobreexpresión promueve la proliferación celular descontrolada; en condiciones normales (proto-oncogén) controla el crecimiento celular regulado. Ejemplos: *RAS*, *MYC*, *HER2*.

Bioinformática

Disciplina que aplica métodos computacionales y estadísticos al análisis de datos biológicos de gran escala, especialmente secuencias de ADN, ARN y proteínas. Es indispensable para la interpretación de datos de NGS en el laboratorio molecular clínico.

ARN de interferencia (ARNi)

Mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional mediado por pequeñas moléculas de ARN de doble cadena (siARN) o microARN (miARN), que inducen la degradación o inhibición de la traducción de ARNm específicos.

Resumen

La biología molecular es la disciplina científica que estudia los mecanismos moleculares subyacentes a los procesos biológicos, con especial énfasis en el flujo de información genética desde el ADN hasta las proteínas funcionales. Su surgimiento como disciplina integrada ocurrió gradualmente durante el siglo XX, impulsado por hitos experimentales que fueron revelando la naturaleza química de la herencia, la estructura del ADN, el código genético y los mecanismos moleculares de la replicación, transcripción y traducción. Desde el experimento de Avery, MacLeod y McCarty en 1944 hasta la finalización del Proyecto Genoma Humano en 2003, menos de seis décadas transformaron irreversiblemente la comprensión de la vida a escala molecular (Collins et al., 2003).

El dogma central de la biología molecular, formulado por Francis Crick en 1958 y ampliado en 1970, sintetiza este conocimiento: la información genética fluye del ADN al ARN y del ARN a la proteína. Las excepciones documentadas —transcripción inversa en retrovirus, ribozimas, priones, ARN no codificantes— no invalidan el principio general, sino que revelan la riqueza y complejidad del sistema informacional de la vida (Crick, 1970). Este marco conceptual es el esqueleto que organiza todos los capítulos subsiguientes de este texto.

Para el bioquímico farmacéutico, la biología molecular no es una disciplina abstracta sino la base de competencias profesionales concretas y de creciente relevancia: la realización e interpretación de pruebas de PCR, la genotipificación farmacogenómica para personalizar tratamientos, el diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias e infecciosas, la validación de biomarcadores tumorales y el manejo responsable de la información genómica de los pacientes. El laboratorio clínico del siglo XXI es, en gran medida, un laboratorio molecular, y el BQF está en el centro de ese espacio (Weinshilboum & Wang, 2017).

La comprensión profunda de esta disciplina, que se irá construyendo a lo largo de los 15 capítulos de este texto, es insustituible para ejercer el rol analítico, interpretativo y asesorial que el siglo XXI exige del BQF. En los capítulos que siguen se irán explorando, con progresiva profundidad, las moléculas del dogma central (capítulos 2–3), los mecanismos de replicación y reparación del ADN (capítulo 4), los fundamentos de la herencia mendeliana y molecular (capítulos 5–7), la regulación de la expresión génica (capítulo 8), los mecanismos

postraduccionales (capítulo 9), la epigenética (capítulo 10), la genética del cáncer (capítulos 11–12), las técnicas de diagnóstico molecular (capítulos 13–14) y la farmacogenómica en profundidad (capítulo 15). Cada capítulo construye sobre el anterior, y el hilo conductor es siempre la pregunta: ¿qué significa esto para el ejercicio profesional del BQF?

Un aspecto igualmente importante destacado en este capítulo es la dimensión ética del trabajo con información genómica. El BQF que trabaja en biología molecular clínica maneja información que afecta no solo al paciente individual sino potencialmente a toda su familia biológica. La aplicación correcta de los principios de consentimiento informado, confidencialidad y comunicación responsable de resultados es tan parte del ejercicio profesional de la biología molecular como el dominio técnico de la PCR o la secuenciación. La integración de competencias técnicas, interpretativas y éticas es lo que define al BQF como profesional de la salud molecular, no solo como técnico de laboratorio (Nussbaum et al., 2016).

Finalmente, este capítulo ha introducido las principales herramientas tecnológicas de la biología molecular moderna: PCR en sus múltiples variantes, secuenciación de Sanger, NGS, CRISPR-Cas9, bioinformática y análisis de bases de datos. Estas tecnologías no son independientes de los mecanismos moleculares que se estudiarán en los capítulos siguientes: la PCR explota la replicación del ADN; la secuenciación se basa en los mismos principios de síntesis de ADN; CRISPR utiliza el mecanismo de reparación del ADN para editar el

genoma. Comprender las herramientas moleculares exige comprender los mecanismos moleculares que las sustentan (Alberts et al., 2022).

Este primer capítulo ha proporcionado las coordenadas conceptuales e históricas necesarias para ese viaje. Las preguntas que Mendel, Avery, Watson, Crick, Nirenberg, Mullis y muchos otros intentaron responder —¿qué es el material genético?, ¿cómo se transmite?, ¿cómo se expresa?, ¿cómo puede fallar?— son exactamente las preguntas que subyacen a cada prueba diagnóstica molecular que el BQF realizará a lo largo de su carrera profesional (Alberts et al., 2022).

CAPÍTULO II

2 MOLÉCULAS INFORMACIONALES: ADN, ARN Y PROTEÍNAS

En el capítulo anterior se estableció el marco histórico y conceptual de la biología molecular y el dogma central como principio organizador del flujo de información genética. A partir de este capítulo comenzamos a explorar, en profundidad, las moléculas protagonistas de ese flujo: el ácido desoxirribonucleico (ADN), el ácido ribonucleico (ARN) y las proteínas. Conocer su estructura no es un fin en sí mismo: es la base para comprender cómo funcionan, cómo interactúan y cómo pueden fallar en la enfermedad.

2.1 Introducción

La vida a nivel molecular es, en esencia, la historia de tres tipos de macromoléculas que se leen unas a otras en una cadena de información precisa y reproducible. El ADN almacena la información; el ARN la transporta y procesa; las proteínas la ejecutan. Esta división del trabajo, elegante en su simplicidad conceptual, esconde una riqueza estructural y funcional extraordinaria (Alberts et al., 2022).

Los nucleótidos —unidades monoméricas del ADN y el ARN— son moléculas relativamente sencillas, pero la manera en que se polimerizan y se aparean determina propiedades emergentes de enorme complejidad: la complementariedad de cadenas que permite la replicación fiel del genoma, la formación de estructuras secundarias

del ARN que regulan la expresión génica, y la especificidad de unión de las proteínas a sus dianas moleculares (Lodish et al., 2021).

Para el bioquímico farmacéutico, el conocimiento de la estructura de estas macromoléculas es directamente funcional. La cuantificación de ADN por absorbancia a 260 nm, la distinción entre los tipos de ARN en una muestra de laboratorio, la comprensión del plegamiento proteico como base del diseño de inhibidores farmacológicos, y la interpretación de los resultados de electroforesis en gel son competencias imposibles sin una sólida comprensión estructural de las tres macromoléculas informacionales (Harvey, 2019). La estructura determina la función; la función determina la patología; la patología determina el diagnóstico y el tratamiento.

2.2 Objetivos de Aprendizaje

1. Describir la estructura de un nucleótido identificando sus tres componentes (base nitrogenada, azúcar y fosfato) y distinguiendo los tipos presentes en el ADN y el ARN.

2. Explicar la estructura de doble hélice del ADN incluyendo el apareamiento de bases, la polaridad antiparalela, y los surcos mayor y menor.

3. Clasificar los tipos principales de ARN (mensajero, transferidor, ribosomal) y los ARN no codificantes (miARN, siARN, lncARN) describiendo su función en la expresión génica.

4. Distinguir los cuatro niveles de organización estructural de las proteínas y relacionarlos con la función proteica y las consecuencias del mal plegamiento.

5. Aplicar el principio de la absorbancia a 260 nm y la relación A260/A280 para evaluar la pureza y cantidad de una muestra de ácido nucleico en el laboratorio.

6. Relacionar las estructuras secundarias del ARN con su capacidad para adquirir funciones reguladoras y catalíticas no presentes en el ADN.

2.3 Preguntas de Enfoque

1. ¿Por qué el apareamiento estricto entre bases complementarias (A-T y G-C) es indispensable para la replicación fiel del genoma?

2. ¿Cómo la estructura de cadena sencilla del ARN le permite adquirir funciones que el ADN de doble cadena no puede cumplir? **3.** ¿De qué manera la estructura primaria de una proteína determina inevitablemente su función?

4. Si la relación A260/A280 de una muestra de ADN es 1.5, ¿qué indica eso sobre la calidad de la extracción y qué pasos se deben tomar?

5. ¿Por qué los miARN son considerados reguladores postranscripcionales de la expresión génica y qué implicaciones tiene esto para el desarrollo de nuevos fármacos?

2.4 Nucleótidos: las unidades monoméricas

Los nucleótidos son las unidades monoméricas que componen tanto el ADN como el ARN. Cada nucleótido está formado por tres componentes:

1. **Una base nitrogenada**: puede ser una *purina* (adenina, A; guanina, G, con estructura de doble anillo) o una *pirimidina* (citosina, C; timina, T en el ADN; uracilo, U en el ARN, con estructura de un solo anillo).

2. **Un azúcar pentosa**: desoxirribosa en el ADN (carece del grupo –oh en el carbono 2') o ribosa en el ARN.

3. **Uno o más grupos fosfato**: que forman el enlace fosfodiéster entre nucleótidos consecutivos (Karp et al., 2019). Los nucleósidos trifosfato (dNTP o NTP) son las formas activas como sustratos para las polimerasas.

El enlace entre nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato del carbono 5' de un nucleótido y el grupo –oh del carbono 3' del nucleótido previo, generando el **enlace fosfodiéster**. Esta cadena de azúcar-fosfato constituye el esqueleto de la molécula de ADN o ARN, con las bases nitrogenadas proyectándose perpendicularmente hacia el interior (en el ADN, donde forman los pares de bases) (Watson et al., 2014).

Concepto Clave

El **enlace fosfodiéster** conecta el grupo 3'–oh de un nucleótido con el fosfato del grupo 5' del siguiente, generando una cadena con polaridad definida: el extremo 5' posee un fosfato libre y el extremo 3' posee un

grupo hidroxilo libre. Toda la maquinaria molecular lee y sintetiza estas cadenas en dirección 5'→3', del extremo con fosfato libre al extremo con hidroxilo libre.

2.4.1 Diferencias funcionales entre ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos

La diferencia aparentemente mínima —un grupo hidroxilo en el carbono 2' de la ribosa del ARN versus un hidrógeno en el ADN— tiene consecuencias funcionales profundas:

El grupo 2'–oh del ARN hace la molécula más susceptible a la hidrólisis alcalina, lo que contribuye a su mayor inestabilidad relativa al ADN. Esto explica por qué el ARN en el laboratorio requiere condiciones más cuidadosas de manejo. El 2'–oh permite al ARN adoptar estructuras tridimensionales más diversas mediante interacciones intramoleculares adicionales, haciendo posible la estructura en «trébol» del ARNt. Es la base del mecanismo catalítico de algunas ribozimas: el 2'–oh puede actuar como nucleófilo en reacciones de escisión del fosfodiéster (Alberts et al., 2022).

La sustitución de timina (T) por uracilo (U) en el ARN también tiene significado funcional: el uracilo carece del grupo metilo en la posición 5 que posee la timina. En el ADN, la presencia de timina (en lugar de uracilo) protege el genoma de las consecuencias de la desaminación espontánea de la citosina, que produce uracilo y sería difícil de distinguir del uracilo «normal» si el ADN usara uracilo (Lewin et al., 2022).

Tabla 5. Comparación estructural entre ADN y ARN

Característica	ADN	ARN
Azúcar	Desoxirribosa (sin –OH en C2')	Ribosa (con –OH en C2')
Bases nitrogenadas	A, T, G, C	A, U, G, C
Número de cadenas	Doble (bicatenario)	Simple (monocatenario)
Forma	Doble hélice B, A o Z	Variada (horquillas, tréboles)
Estabilidad	Alta (mayor vida media)	Menor (susceptible a RNasa)
Función principal	Almacenamiento de información	Transferencia y expresión génica
Capacidad catalítica	No (en condiciones normales)	Sí (ribozimas)
Modificaciones frecuentes	Metilación 5-metilcitosina	m6A, pseudouridina, inosina

Fuente: Alberts et al. (2022) y Lodish et al. (2021).

¡Importante!

Error frecuente: La afirmación de que el ADN es «la única molécula capaz de replicarse» confunde el mecanismo de replicación (que require polimerasas, no es intrínseco al ADN) con la propiedad estructural de complementariedad. Del mismo modo, decir que el ARN «siempre es de cadena sencilla» omite casos importantes como el ARN bicatenario en virus (ARN bicatenario de rotavirus, por ejemplo) y las estructuras de doble cadena que forman los dúplex siARN utilizados en interferencia de ARN. Los enunciados en biología molecular deben contextualizarse correctamente (Lewin et al., 2022).

2.5 Estructura del ADN: la doble hélice

La propuesta de Watson y Crick (1953) describió el ADN como una doble hélice compuesta por dos cadenas de polinucleótidos antiparalelas (una corre de 5'→3' y la otra de 3'→5') enrolladas helicoidalmente alrededor de un eje central. Las bases nitrogenadas se proyectan hacia el interior de la hélice, orientadas perpendicularmente al eje, y los esqueletos azúcar-fosfato discurren por el exterior.

2.5.1 Reglas de Chargaff y apareamiento de bases

Antes del modelo de Watson y Crick, Erwin Chargaff había establecido empíricamente que en cualquier organismo:

$[A] = [T]$ $[G] = [C]$

Esto refleja el apareamiento específico de bases complementarias:

Adenina (A) se aparea con **Timina (T)** mediante *dos* puentes de hidrógeno.

Guanina (G) se aparea con **Citosina (C)** mediante *tres* puentes de hidrógeno (Watson et al., 2014).

El mayor número de puentes G-C hace que el ADN con mayor contenido G+C sea más estable térmicamente (mayor *temperatura de fusión*, *Tm*). Esta propiedad es explotada en el diseño de cebadores de PCR: un cebador con alto contenido G+C tiene una *Tm* más alta y se hibridará de forma más estable con su diana, reduciendo la posibilidad de apareamientos inespecíficos.

¿Sabías que. . . ?

El principio de Chargaff fue un hallazgo crítico cuya importancia no fue reconocida de inmediato por su propio descubridor. Chargaff publicó la igualdad [A]=[T] y [G]=[C] en 1950, pero no propuso un modelo estructural que la explicara. Fue Watson y Crick —utilizando esa información junto con las imágenes de difracción de Franklin— quienes comprendieron que la igualdad de purinas y pirimidinas era consecuencia directa del apareamiento intracatenario en una doble hélice (Watson et al., 2014).

2.5.2 Características estructurales de la doble hélice

La forma canónica del ADN en condiciones fisiológicas es la **hélice B**:

Giro dextrógiro (hacia la derecha). Aproximadamente 10 pares de bases por vuelta helicoidal. Distancia entre pares de bases consecutivos: 0,34 nm; paso de hélice: 3,4 nm. Diámetro de 2 nm. Surco mayor (ancho, accesible) y surco menor (estrecho) en el exterior, donde se unen proteínas reguladoras que «leen» la identidad de las bases sin necesidad de separar las cadenas (Alberts et al., 2022).

Las formas alternativas **A** (hélice más compacta, mayor número de pares por vuelta, en ADN deshidratado o en híbridos ADN:ARN) y **Z** (hélice levógira, en regiones ricas en G-C, asociadas con regulación transcripcional) son menos frecuentes en condiciones fisiológicas (Lodish et al., 2021). Los híbridos ADN:ARN en forma A son relevantes en la transcripción inversa y en los mecanismos de reparación del ADN.

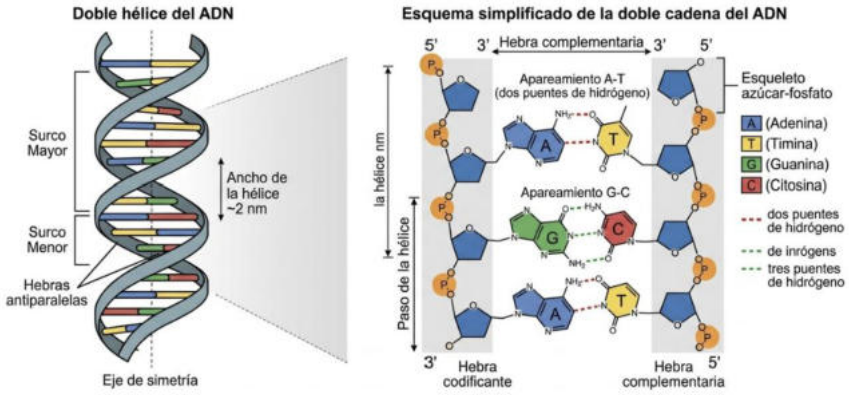


Figura 4. Esquema simplificado de la doble cadena del ADN.

Se muestran las cadenas antiparalelas, el apareamiento de bases A-T (dos puentes de hidrógeno, en rojo discontinuo) y G-C (tres puentes de hidrógeno, en verde discontinuo). Las cadenas corren antiparalelas: 5'→3' de arriba a abajo en la cadena izquierda, 3'→5' en la cadena derecha. Elaboración propia basada en Watson y Crick (1953) y Alberts et al. (2022).

2.5.3 Desnaturalización y renaturalización

La doble hélice puede separarse mediante calor o condiciones alcalinas extremas (**desnaturalización**). La temperatura a la que el 50 % de las moléculas está desnaturalizada se denomina **temperatura de fusión** (*Tm*). Un ADN rico en G-C tiene mayor *Tm* debido a los tres puentes de hidrógeno de cada par G-C (Karp et al., 2019). La *Tm* del ADN genómico humano es de aproximadamente 87 ^(◦)C en condiciones estándar de salinidad.

Al enfriarse gradualmente, las cadenas complementarias pueden reasociarse en un proceso llamado **renaturalización** o **hibridación**. Este principio es la base de las técnicas de hibridación molecular: si una sonda de ADN o ARN de secuencia conocida se incuba con una muestra, se unirá selectivamente a su complementaria. Las técnicas de *Southern blot* (Southern, 1975), *Northern blot*, FISH y los microarreglos se basan en este principio (Lodish et al., 2021).

La cinética de renaturalización depende de la concentración de las cadenas complementarias y de la complejidad del genoma. El análisis C0t (concentración inicial × tiempo de incubación) permite estimar la complejidad del genoma y fue la base de los primeros estudios que revelaron la presencia de secuencias repetidas en el genoma humano.

2.6 Estructura del ARN: tipos y funciones

El ARN se diferencia del ADN en tres aspectos estructurales: posee ribosa (no desoxirribosa), uracilo en lugar de timina, y generalmente es de cadena sencilla. Esta cadena sencilla le permite adoptar estructuras secundarias intramoleculares —bucles, horquillas, pseudonudos— que son fundamentales para su función (Alberts et al., 2022).

2.6.1 Estructuras secundarias del ARN

Aunque el ARN es esencialmente de cadena sencilla, las regiones con complementariedad interna se aparean formando estructuras secundarias estables:

Horquilla (stem-loop): La estructura secundaria más simple; una región de doble cadena (tallo) seguida de una curva monocatenaria (bucle). Abundante en todos los tipos de ARN.

Asa de trébol: Estructura característica del ARNt; múltiples tallos-bucles que se pliegan en una forma tridimensional de «L» cuando se considera la estructura terciaria.

Pseudonudo: Estructura compleja donde el bucle de una horquilla forma pares de bases con regiones externas; relevante en el mecanismo de acción de ribozimas y en elementos ribosomales.

G-cuádruple (*G-quadruplex*): Estructuras formadas por guaninas en secuencias ricas en G; presentes en regiones teloméricas del ADN y en el ARN, con funciones reguladoras emergentes (Lewin et al., 2022).

2.6.2 ARN mensajero (ARNm)

El ARNm es el intermediario del dogma central: lleva la información del gen al ribosoma para la síntesis proteica. En eucariotas, el ARNm maduro posee:

Caperuza 5' (*cap*): estructura de 7-metilguanosina que protege el extremo 5' de la degradación por exonucleasas y facilita el reconocimiento ribosomal y la exportación nuclear.

Regiones no traducidas (UTR): la 5'-UTR regula la eficiencia de inicio de la traducción; la 3'-UTR contiene señales de estabilidad, poliadenilación y sitios de unión de miARN.

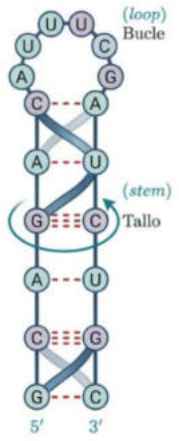


Figura 5. Estructura secundaria de horquilla (stem-loop) del ARN.

Las regiones complementarias de una cadena sencilla de ARN forman un tallo bicatenario estabilizado por puentes de hidrógeno (líneas discontinuas rojas); el extremo libre forma el bucle monocatenario. Esta estructura es la unidad repetida en todas las estructuras secundarias complejas del ARN. Elaboración propia basada en Alberts et al. (2022).

Marco de lectura abierto (ORF): secuencia codificante entre el codón de inicio (AUG) y el codón de parada (UAA, UAG, UGA). **Cola de poli-A:** cadena de aproximadamente 200 adeninas en el extremo 3’, que estabiliza el ARNm y facilita su transporte al citoplasma (Lewin et al., 2022).

El splicing alternativo permite que un mismo gen produzca múltiples isoformas de ARNm —y por tanto múltiples proteínas— mediante la inclusión o exclusión selectiva de exones. Se estima que el 95 % de los

genes humanos con múltiples exones sufren splicing alternativo, lo que multiplica la complejidad proteómica humana muy por encima del número de genes (Alberts et al., 2022).

2.6.3 ARN de transferencia (ARNt)

El ARNt es el adaptador molecular que traduce el lenguaje de los codones al lenguaje de los aminoácidos. Tiene una estructura en «hoja de trébol» en su forma secundaria, con cuatro regiones helicoidales y varias asas. En su estructura terciaria adopta la forma de una «L», con el anticodón en un extremo y el sitio de unión del aminoácido en el otro extremo. El **anticodón** (en el asa D) es complementario al codón del ARNm, mientras que el extremo 3'–CCA lleva el aminoácido correspondiente unido covalentemente por la aminoacil-ARNt sintetasa correspondiente (Karp et al., 2019).

Existen al menos 61 ARNt distintos para los 61 codones senso, aunque en la práctica el genoma humano codifica ∼500 genes para ARNt, con múltiples genes para los ARNt más demandados. Las mutaciones en genes de ARNt, especialmente mitocondriales, causan enfermedades como la encefalomiopatía MELAS (*mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*) (Strachan & Read, 2019).

2.6.4 ARN ribosomal (ARNr)

El ARNr es el componente más abundante del ribosoma y desempeña funciones tanto estructurales como catalíticas. El ribosoma eucariota (80S) está compuesto por:

Subunidad grande (60S): contiene los ARNr 28S, 5.8S y 5S. **Subunidad pequeña (40S):** contiene el ARNr 18S (Alberts et al., 2022).

El ARNr 28S de la subunidad grande posee actividad **peptidiltransferasa** —es una ribozima— que cataliza la formación del enlace peptídico durante la traducción. El centro peptidiltransferasa está completamente compuesto de ARN: ninguna proteína ribosomal está en contacto directo con los ARNt o el ARNm durante la formación del enlace peptídico, lo que constituye evidencia de que el ribosoma es, en esencia, una ribozima gigante.

2.6.5 ARN no codificantes (ncARN)

Los avances del Proyecto Genoma Humano y la biología funcional revelaron que la mayoría del ARN transcrito en eucariotas no codifica proteínas. Estos **ARN no codificantes** tienen funciones reguladoras cruciales:

miARN (microARN, ≈21–23 nt): Se unen a la 3'-UTR de los ARNm diana y los degradan o inhiben su traducción; regulan miles de genes y están implicados en desarrollo, diferenciación y cáncer. Descubiertos por Fire et al. (1998) mediante el fenómeno de interferencia de ARN en *C. elegans* (Premio Nobel 2006 a Fire y Mello). El primer miARN humano (lin-4) fue caracterizado por Bartel (2004). **siARN (ARN de interferencia corto, ≈21–23 nt):** Median el silenciamiento génico postranscripcional (ARN interferente); son de doble cadena perfectamente complementaria al ARNm diana; base de la tecnología

de *RNA interference (RNAi)* con aplicaciones terapéuticas crecientes (Fire et al., 1998).

lncARN (ARN no codificante largo, > 200 nt**):** Regulan la expresión génica a nivel epigenético, transcripcional y postranscripcional; el lncARN *XIST* es fundamental para la inactivación del cromosoma X; *HOTAIR* regula expresión de genes Hox y está sobreexpresado en varios cánceres (Strachan & Read, 2019). **snARN y snoARN:** Los ARN nucleares pequeños (*small nuclear RNA*, snARN) forman parte del espliceosoma y participan en el splicing del ARNm; los ARN nucleolares pequeños (*small nucleolar RNA*, snoARN) guían la modificación química de los ARNr (Alberts et al., 2022).

Tabla 6. Tipos de ARN y sus funciones principales.

Tipo	**Tamaño aprox.**	**Función**	**Relevancia clínica**
ARNm	400–10.000 nt	Codifica proteínas	Cuantificación por RT-qPCR
ARNt	73–93 nt	Transporta aminoácidos al ribosoma	Mutaciones en ARNt mitocondrial
ARNr	120–5.000 nt	Componente estructural/catalítico del ribosoma	Diana de antibióticos
miARN	21–23 nt	Silenciamiento postranscripcional	Biomarcadores de cáncer
siARN	21–23 nt	Silenciamiento génico por RNAi	Terapias génicas aprobadas
lncARN	>200 nt	Regulación epigenética y	XIST (inactivación

		transcripcional	cromosoma X)
snARN	100–300 nt	Componente del espliceosoma	Mutaciones en snARN causan enf. raras

Fuente: Alberts et al. (2022), Lewin et al. (2022) y Strachan & Read (2019).

2.7 Aminoácidos y estructura de proteínas

Las proteínas son los ejecutores del dogma central: realizan prácticamente todas las funciones biológicas de la célula, desde catálisis enzimática hasta señalización, estructura, transporte y defensa. Están formadas por cadenas de aminoácidos unidos por **enlaces peptídicos**.

2.7.1 Aminoácidos: estructura general y clasificación

Los 20 aminoácidos estándar comparten la misma estructura: un carbono central (*alfa-carbono*, Cα) unido a un grupo amino (–NH2), un grupo carboxilo (–COOH), un hidrógeno y una cadena lateral (**grupo R**) que les da su identidad química. Excepto la glicina (cuyo grupo R es simplemente un H), todos los aminoácidos son quirales: la forma L (levógira) es la biológicamente relevante en las proteínas (Harvey, 2019).

Los aminoácidos se clasifican según la polaridad y carga de su cadena R:

No polares (hidrofóbicos): Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met — tienden a localizarse en el interior hidrofóbico de las proteínas globulares. **Polares neutros:** Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln — pueden

participar en puentes de hidrógeno; las cisteínas pueden formar puentes disulfuro. **Con carga positiva (básicos):** Lys, Arg, His — cargados positivamente a pH fisiológico. **Con carga negativa (ácidos):** Asp, Glu — cargados negativamente a pH fisiológico (Karp et al., 2019).

2.7.2 Los cuatro niveles de organización estructural

1. **Estructura primaria**: Secuencia lineal de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Es la «traducción directa» del ARNm y determina todos los niveles superiores de organización. Las bases de datos de secuencias proteicas (UniProt, PDB) almacenan millones de secuencias primarias con sus funciones anotadas.

2. **Estructura secundaria**: Estructuras regulares locales estabilizadas por puentes de hidrógeno entre los átomos del esqueleto peptídico. Las más frecuentes son la **hélice** α (espiral hacia la derecha con 3.6 residuos por vuelta, rise de 0,15 nm por residuo) y la **lámina** β (cadenas extendidas paralelas o antiparalelas) (Alberts et al., 2022).

3. **Estructura terciaria**: Plegamiento tridimensional global de una cadena polipeptídica, estabilizado por: puentes disulfuro (entre cisteínas), interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno entre cadenas R, e interacciones iónicas (electrostáticas). Determina el **sitio activo** de las enzimas y la especificidad de unión a ligandos y dianas farmacológicas (Lodish et al., 2021).

4. **Estructura cuaternaria**: Asociación de dos o más cadenas polipeptídicas (subunidades) mediante interacciones no covalentes. Ejemplo: la hemoglobina (2 subunidades α y 2 subunidades β); la

ADN polimerasa (múltiples subunidades con funciones especializadas) (Harvey, 2019).

¡Importante!

Una mutación de un solo aminoácido en la estructura primaria puede alterar completamente el plegamiento y la función de una proteína. El ejemplo más conocido es la **anemia falciforme**: la sustitución del ácido glutámico (polar, negativo) por valina (no polar, hidrofóbico) en la posición 6 de la cadena β de la hemoglobina ((Ingram, 1957)) crea un «parche hidrofóbico» en la superficie de la proteína que favorece la polimerización en condiciones de baja pO2, generando los eritrocitos en forma de hoz. Esta relación directa estructura primaria →estructura terciaria → función →patología es el paradigma de la «enfermedad molecular» (Nussbaum et al., 2016).

2.7.3 Plegamiento de proteínas, chaperonas y enfermedades por mal plegamiento

El plegamiento de una proteína desde su cadena polipeptídica lineal hasta su estructura tridimensional funcional es un proceso rápido y espontáneo guiado por la estructura primaria. Sin embargo, en la célula este proceso es asistido por **chaperonas moleculares**: proteínas que previenen el plegamiento incorrecto o la agregación de cadenas polipeptídicas durante su síntesis. Las chaperonas Hsp70 y Hsp90 son ejemplos en eucariotas (Alberts et al., 2022).

El mal plegamiento proteico tiene consecuencias patológicas graves. Las **enfermedades de plegamiento incorrecto** (*protein misfolding diseases*) incluyen:

Enfermedades por priones: El PrP^(Sc) mal plegado actúa como «molde» que induce el mal plegamiento del PrP^(C) normal, con consecuencias neuropatológicas irreversibles (Creutzfeldt-Jakob, kuru).

Enfermedades por amiloide: Depósito de agregados proteicos insolubles (*β*amiloide en Alzheimer, IAPP en diabetes tipo 2, *α*-sinucleína en Parkinson). La fibra amiloide tiene estructura rica en láminas *β*, independientemente de la proteína que la forma.

Fibrosis quística: La variante más común (p.Phe508del) produce una proteína CFTR que no se pliega correctamente, es retenida en el retículo endoplásmico y degradada por proteosoma, en lugar de llegar a la membrana apical (Kerem et al., 1989).

Para el BQF, las enfermedades de mal plegamiento son relevantes tanto en el diagnóstico molecular (identificación de variantes patogénicas) como en la farmacología (nuevos fármacos llamados «correctores» y «potenciadores» del CFTR que apuntan a rescatar el plegamiento defectuoso de la proteína) (Harvey, 2019).

2.7.4 Clasificación funcional de proteínas

Las proteínas se clasifican en función de su rol biológico en:

Enzimas: Catalizadoras de reacciones químicas; aumentan la velocidad de reacción sin consumirse (ej. ADN polimerasa, ARN polimerasa, citocromo P450).

Proteínas estructurales: Actina, miosina, tubulina, colágeno, queratina.

Proteínas de transporte: Hemoglobina (O2), albúmina (ácidos grasos, fármacos), transferrina (hierro).

Receptores: Reconocen señales extracelulares e inician cascadas de transducción (receptores tirosina-quinasa, GPCRs).

Proteínas reguladoras: Factores de transcripción (p53, NF-κB), histonas.

Anticuerpos (inmunoglobulinas): Reconocen y neutralizan antígenos; base de los ensayos ELISA e inmunocromatográficos (Karp et al., 2019).

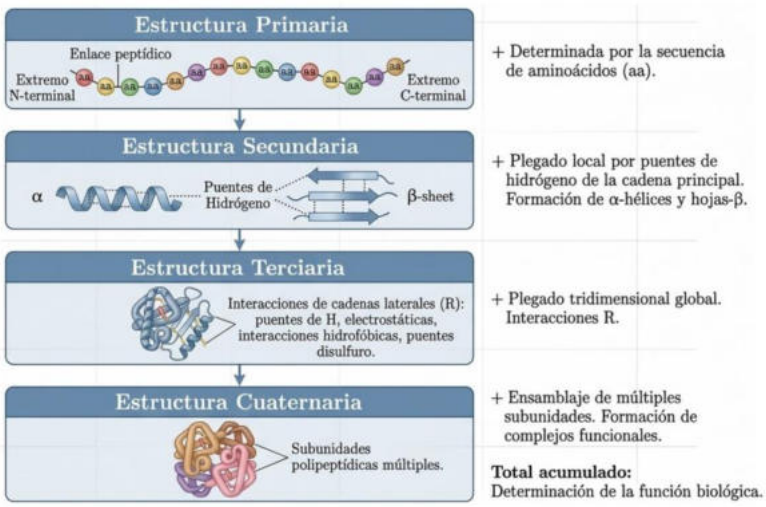


Figura 6. Niveles de organización estructural de las proteínas.

Cada nivel superior emerge de las propiedades del nivel anterior; la estructura primaria determina en última instancia todos los niveles de plegamiento y la función biológica. Elaboración propia basada en Alberts et al. (2022) y Harvey (2019). aa = aminoácidos.

2.8 Cuantificación de ácidos nucleicos en el laboratorio

Una de las competencias técnicas fundamentales del BQF que trabaja con biología molecular es la evaluación de la cantidad y pureza del ADN o ARN extraído de una muestra biológica. La integridad de la muestra es el determinante más crítico del éxito de cualquier análisis molecular posterior.

2.8.1 Espectrofotometría a 260/280 nm

Las bases nitrogenadas del ADN y el ARN absorben luz ultravioleta con un máximo a 260 nm (*A*260). Las proteínas (especialmente los

aminoácidos aromáticos Trp y Tyr) absorben a 280 nm (*A*280). La relación *A*260/*A*280 es un indicador estándar de pureza:

*A*260/*A*280 ≈1,8: ADN puro. *A*260/*A*280 ≈2,0: ARN puro. *A*260/*A*280 < 1,7: contaminación proteica probable. *A*260/*A*280 > 2,2: posible contaminación con ARN en muestras de ADN (Bustin et al., 2009).

La relación *A*260/*A*230 informa sobre contaminantes como guanidinio, fenol o carbohidratos (absorben a 230 nm). El valor óptimo es 2.0–2.2; valores menores indican posible inhibición de la PCR por estos contaminantes.

La concentración se calcula usando la ley de Lambert-Beer:

$$C\ [\mu g\,mL^{-1}] = A_{260} \times \varepsilon \times \text{dilución}$$

Donde ε es el coeficiente de extinción:

- ADN bicatenario: ε = 50 µg mL^(−)¹ por unidad de *A*260
- ARN: ε = 40 µg mL^(−)¹ por unidad de *A*260
- ADN monocatenario: ε = 37 µg mL^(−)¹ por unidad de *A*260 (Karp et al., 2019)

2.8.2 Evaluación de integridad del ARN

Para el ARN, la medición espectrofotométrica informa de la concentración pero no de la integridad. La **electroforesis en gel de agarosa** (con o sin agentes desnaturalizantes como formaldehído) permite visualizar las bandas de los ARNr 28S y 18S. En ARN íntegro,

la banda 28S debe ser dos veces más intensa que la banda 18S. Un ARN degradado mostrará un fondo difuso sin bandas discretas.

Los sistemas de análisis automatizado (*Bioanalyzer*, *TapeStation*) proporcionan el **número de integridad del ARN** (rin), en escala de 1 a 10. Muestras con RIN ≥7 son generalmente adecuadas para RNA-seq y RT-qPCR; muestras con RIN < 6 producen resultados sesgados en análisis cuantitativos (Bustin et al., 2009).

En el Laboratorio

Protocolo de cuantificación de ADN genómico por espectrofotometría (NanoDrop) Materiales: Espectrofotómetro de microvolumen (NanoDrop 2000 o equivalente), micropipeta 1 µL, agua ultrapura libre de nucleasas, muestra de ADN extraída. **Procedimiento:**

1. Limpiar el pedestal con 1 µL de agua ultrapura y secar con papel óptico.

2. Cargar 1 µL de agua como blanco y medir.

3. Cargar 1 µL de la muestra y registrar *A*260, *A*280, *A*230 y las relaciones *A*260/*A*280 y *A*260/*A*230.

4. Interpretar: relación 1.7–2.0 (*A*260/*A*280) y 2.0–2.2 (*A*260/*A*230) indica muestra apta.

Criterio de calidad: Si *A*260/*A*280 < 1,7, revisar el protocolo de extracción o proceder con purificación adicional (precipitación en etanol, limpieza con columna) antes de usar la muestra en PCR o

secuenciación. Si *A*260/*A*230 < 1,8, evaluar inhibición de la PCR antes de reportar resultados (Bustin et al., 2009).

Aplicación para el Bioquímico Farmacéutico

Cuando el BQF recibe una muestra de sangre periférica para extracción de ADN destinada a secuenciación de variantes en genes de susceptibilidad a cáncer (p. ej., *BRCA1*/*BRCA2*), la evaluación de la calidad del ADN extraído es el primer paso crítico: un ADN degradado o contaminado producirá resultados de secuenciación no interpretables. La comprensión del principio de absorción a 260 y 280 nm permite al BQF tomar la decisión informada de proceder o repetir la extracción. Para muestras de ARN destinadas a RT-qPCR de biomarcadores de expresión génica (por ejemplo, detección de fusiones génicas en leucemia mieloide crónica: *BCR-ABL1*), es además fundamental evaluar la integridad del ARN mediante el RIN. Un ARN degradado sobreestimará la expresión de genes cuyos amplificones están en la región 3’ del ARNm y subestimará los de la región 5’, generando falsos positivos o negativos en el diagnóstico molecular (Bustin et al., 2009).

Caso Clínico

Situación: En un laboratorio de diagnóstico molecular, el BQF realiza la extracción de ADN a partir de 5 mL de sangre periférica de un paciente pediátrico con sospecha de leucemia mieloide crónica. Al cuantificar el ADN obtenido, obtiene los siguientes valores: *A*260 = 0,42; *A*260/*A*280 = 1,51; *A*260/*A*230 = 1,65; concentración calculada = 21 µg mL^(−)¹.

Preguntas para el análisis:

1. ¿Es esta muestra apta para ser enviada a secuenciación de paneles génicos? Justifique basándose en los criterios de pureza.

2. ¿Qué posibles causas explicarían una relación $A260/A280$ de 1.51 y una $A260/A230$ de 1.65?

3. ¿Qué pasos de purificación adicionales podría realizar el BQF para mejorar la calidad de la muestra?

4. Si la concentración calculada es 21 µg mL^(−)¹ en 50 µL de elución, ¿cuántos microgramos totales de ADN se obtuvieron? ¿Es suficiente para la secuenciación solicitada (que requiere 500 ng)?

Habiendo comprendido las estructuras del ADN, el ARN y las proteínas, el capítulo 3 profundizará en cómo el ADN se organiza dentro del núcleo celular en una estructura altamente ordenada —la cromatina— y cómo esa organización influye en la regulación de la expresión génica.

Conceptos Clave

Nucleótido Monómero del ADN y ARN; compuesto por base nitrogenada + azúcar pentosa + fosfato. En el ADN: bases A, T, G, C con desoxirribosa. En el ARN: bases A, U, G, C con ribosa.

Enlace fosfodiéster Enlace covalente que une los nucleótidos en el esqueleto azúcarfosfato; conecta el 3’-OH de un nucleótido con el 5’-fosfato del siguiente, definiendo la polaridad 5’→3’.

Reglas de Chargaff En cualquier organismo, $[A] = [T]$ y $[G] = [C]$, reflejando la complementariedad de cadenas en el ADN.

Temperatura de fusión (*Tm*) Temperatura a la que el 50 % del ADN está desnaturalizado; aumenta con el contenido G+C por los tres puentes de hidrógeno del par G-C.

ARNm (ARN mensajero) ARN que porta la información del gen al ribosoma; en eucariotas posee caperuza 5', cola poli-A y regiones UTR con funciones reguladoras.

ARNt (ARN de transferencia) Adaptador molecular que lleva un aminoácido específico al ribosoma; reconoce el codón del ARNm mediante su anticodón complementario.

miARN ARN pequeño no codificante de ≈21 nt que regula postranscripcionalmente la expresión de genes diana uniéndose a la 3'-UTR del ARNm; relevante como biomarcador y diana terapéutica.

Enlace peptídico Enlace covalente amida entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente; forma el esqueleto de las proteínas.

Hélice alfa (α) Estructura secundaria proteica en forma de espiral dextrógira estabilizada por puentes de hidrógeno entre el C=O de un residuo y el N-H del cuarto residuo siguiente.

Lámina beta (β) Estructura secundaria proteica de cadenas extendidas paralelas o antiparalelas estabilizadas por puentes de hidrógeno intermoleculares; base estructural de las fibras amiloides.

Relación A260/A280 Indicador espectrofotométrico de pureza: ≈1.8 para ADN puro, ≈2.0 para ARN puro; valores menores indican contaminación proteica.

Chaperona molecular Proteína que asiste el plegamiento correcto de otras proteínas previniendo la agregación; ejemplos Hsp70, Hsp90. Su deficiencia o saturación contribuye a enfermedades de mal plegamiento.

2.9 Preguntas de Autoevaluación

A. Opción múltiple

1. ¿Cuál es la diferencia estructural entre la ribosa del ARN y la desoxirribosa del ADN?

(a) La ribosa tiene timina; la desoxirribosa tiene uracilo

(b) **La ribosa tiene un grupo –OH en el carbono 2'; la desoxirribosa tiene solo un –H**

(c) La desoxirribosa es más grande que la ribosa

(d) Solo la ribosa puede formar puentes de hidrógeno

2. Según las reglas de Chargaff, en una molécula de ADN donde el 30 % son bases adenina, ¿cuál es el porcentaje de guanina?

(a) 30 %

(b) 60 %

(c) **20 %**

(d) 50 %

3. La actividad catalítica de la subunidad grande del ribosoma (peptidiltransferasa) está a cargo de:

(a) Una proteína ribosomal

(b) **El ARNr 28S (una ribozima)**

(c) El ARNt

(d) El factor de elongación EF-2

4. ¿Qué indica una relación A260/A280 de 1.55 en una muestra de ADN?

(a) La muestra es pura y apta para secuenciación

(b) Hay contaminación con ARN

(c) **Probable contaminación proteica; la muestra puede no ser apta para técnicas sensibles**

(d) El ADN está degradado

5. Los miARN ejercen su función reguladora principalmente a nivel:

(a) Transcripcional

(b) Postraduccional

(c) **Postranscripcional**

(d) Replicativo

6. El enlace que une aminoácidos consecutivos en una proteína es:

(a) Enlace glucosídico

(b) **Enlace peptídico (amida)**

(c) Enlace fosfodiéster

(d) Puente disulfuro

7. ¿Cuál de los siguientes ARN es el más abundante en una célula eucariota?

(a) ARNm

(b) miARN

(c) **ARNr**

(d) lncARN

8. La sustitución del residuo Glu-6 por Val-6 en la cadena β de la hemoglobina en la anemia falciforme provoca:

(a) Un error en la transcripción del gen HBB

(b) Una alteración en la estructura terciaria que impide la unión del hemo

(c) **La formación de un parche hidrofóbico que favorece la polimerización en hipoxia**

(d) La síntesis de una hemoglobina con menor afinidad por el O2 **9.** El splicing alternativo en eucariotas permite:

(a) Sintetizar múltiples copias del mismo ARNm

(b) Reparar errores introducidos durante la transcripción

(c) **Producir múltiples proteínas distintas a partir de un solo gen**

(d) Agregar la caperuza 5' al ARNm precursor

10. La relación A260/A230 en la cuantificación de ácidos nucleicos informa sobre:

(a) Contaminación proteica

(b) Degradación del ADN

(c) **Contaminación con fenol, guanidinio u otros contaminantes orgánicos**

(d) La proporción ARN/ADN en la muestra

B. Preguntas de desarrollo

1. Explica por qué el ARN es más susceptible a la degradación enzimática que el ADN. ¿Qué precauciones debe tomar el BQF en el laboratorio para preservar la integridad del ARN durante la extracción y el procesamiento?

2. Un paciente tiene una mutación puntual que sustituye un residuo de glicina (no polar) por un ácido aspártico (ácido, negativo) en el interior

hidrofóbico de una proteína enzimática. Predice el efecto probable sobre la estructura terciaria y la actividad enzimática, justificando tu respuesta con los principios del plegamiento proteico.

3. Describe el procesamiento postranscripcional del ARNm en eucariotas desde la transcripción primaria hasta el ARNm maduro. ¿Por qué este procesamiento es relevante para comprender el fenómeno del splicing alternativo y su papel en la amplificación de la complejidad proteómica?

Glosario

Anticodón Secuencia de tres nucleótidos en el ARNt que es complementaria al codón del ARNm; permite el reconocimiento entre ARNt y ARNm durante la traducción.

Caperuza 5' (*cap*) Modificación en el extremo 5' del ARNm eucariota consistente en una 7-metilguanosina; protege al ARNm de la degradación y facilita el reconocimiento ribosomal.

Cola poli-A Secuencia de ≈200 adeninas adicionada al extremo 3' del ARNm maduro eucariota; contribuye a la estabilidad, exportación nuclear y traducción del mensajero.

Hibridación molecular Proceso por el que dos cadenas de ácidos nucleicos con secuencias complementarias se unen formando un dúplex; base de técnicas como Southern blot, FISH y microarreglos.

Hélice α Estructura secundaria de proteínas en forma de espiral dextrógira estabilizada por puentes de hidrógeno entre el C=O de un

residuo y el N-H del cuarto residuo siguiente; 3.6 aminoácidos por vuelta.

Lámina β Estructura secundaria proteica formada por cadenas polipeptídicas extendidas paralelas o antiparalelas, estabilizadas por puentes de hidrógeno intermoleculares.

Purina Base nitrogenada de doble anillo; adenina y guanina en el ADN y el ARN.

Pirimidina Base nitrogenada de un solo anillo; timina y citosina en el ADN; uracilo y citosina en el ARN.

Ribozima Molécula de ARN con actividad catalítica; el ARNr 28S que cataliza la formación del enlace peptídico es la ribozima más conocida y clínicamente relevante.

RIN (RNA Integrity Number) Número de integridad del ARN, en escala 1–10; proporcionado por sistemas automatizados de electroforesis capilar (Bioanalyzer). Valores ≥7 indican ARN adecuado para análisis cuantitativos.

Surco mayor/menor Depresiones alternadas en el exterior de la doble hélice del ADN; el surco mayor es más accesible y es donde la mayoría de los factores de transcripción leen la secuencia de bases.

ORF (*open reading frame*) Marco de lectura abierto; secuencia de ADN o ARNm que comienza con un codón de inicio (ATG/AUG) y termina con un codón de parada; define la región codificante de un gen.

Splicing alternativo Proceso de procesamiento del ARNm que genera múltiples isoformas proteicas a partir de un solo gen mediante la inclusión o exclusión selectiva de exones; relevante en oncología (variantes de splicing oncogénicas).

2.10 Resumen

Las tres moléculas informacionales de la biología molecular —ADN, ARN y proteínas— poseen estructuras que determinan directamente sus funciones en el dogma central. Los nucleótidos, monómeros formados por base nitrogenada, azúcar pentosa y fosfato, se polimerizan mediante enlaces fosfodiéster para formar cadenas con polaridad 5'→3'. El ADN adopta la doble hélice antiparalela estabilizada por puentes de hidrógeno entre pares de bases complementarios (A-T, 2 puentes; G-C, 3 puentes), siendo el contenido G+C determinante de la estabilidad térmica (Watson et al., 2014).

El ARN, de cadena sencilla y con ribosa y uracilo, existe en diversas formas funcionales: el ARNm porta la información genética al ribosoma y es procesado postranscripcionalmente (caperuza 5', cola poli-A, splicing); el ARNt actúa como adaptador durante la traducción; el ARNr es el componente catalítico del ribosoma (ribozima); y los ARN no codificantes —miARN, siARN, lncARN— regulan la expresión génica a niveles postranscripcional y epigenético. El descubrimiento del mecanismo de interferencia de ARN por Fire et al. (1998) revolucionó la comprensión de la regulación génica postranscripcional y abrió nuevas vías terapéuticas.

Las proteínas se organizan en cuatro niveles estructurales: primario (secuencia de aminoácidos, determinada por el ARNm), secundario (hélice α y lámina β), terciario (plegamiento tridimensional global) y cuaternario (asociación multisubunidad). La estructura primaria, dictada por la información genética, determina inevitablemente todos los niveles superiores y la función proteica. Alteraciones en la secuencia —como la sustitución Glu6Val en la anemia falciforme— pueden subvertir completamente la función de la proteína, ejemplificando el paradigma de las «enfermedades moleculares» (Ingram, 1957).

Para el BQF, la cuantificación y evaluación de la calidad de los ácidos nucleicos mediante las relaciones *A*260/*A*280 y *A*260/*A*230, así como la evaluación de la integridad del ARN mediante el RIN, son competencias técnicas fundamentales que preceden a cualquier técnica molecular de diagnóstico, desde la PCR hasta la secuenciación de nueva generación. Un resultado molecular solo es tan confiable como la calidad de la muestra que lo generó (Bustin et al., 2009).

CAPÍTULO III

3 ORGANIZACIÓN DEL GENOMA, CROMOSOMAS Y ELEMENTOS MÓVILES DEL ADN

El capítulo anterior presentó las moléculas informacionales en su dimensión química y estructural. Ahora nos preguntamos: ¿cómo se empaquetan los 3,2 × 10^9 pares de bases del genoma humano en un núcleo de apenas 6 µm de diámetro? La respuesta a esta pregunta —la organización de la cromatina— es, al mismo tiempo, un mecanismo de compactación y un sistema de regulación: el empaquetamiento del ADN no es estático, sino dinámico, y su estado influye directamente en qué genes se expresan en cada célula y en cada momento.

3.1 Introducción

Si se extendiera linealmente todo el ADN de una célula humana, alcanzaría aproximadamente 2 m de longitud. Su compactación para caber en un núcleo de 6 µm implica un factor de compresión de más de 10.000 veces (Alberts et al., 2022). Pero esta compactación no es simplemente «doblar» el ADN: está organizada en niveles jerárquicos precisos que, además de economizar espacio, regulan el acceso de las enzimas transcripcionales y replicativas a los genes.

La unidad fundamental de organización es el **nucleosoma**: un octámero de histonas alrededor del cual se enrollan 147 pares de bases de ADN. Los nucleosomas se organizan en estructuras de orden superior hasta formar el cromosoma mitótico visible al microscopio óptico. Este capítulo explora los niveles de esta organización

jerárquica, las modificaciones epigenéticas que regulan la expresión génica, y los elementos genéticos móviles —transposones y retrotransposones— que, a lo largo de la evolución, han modelado la arquitectura de los genomas (Lodish et al., 2021).

Para el BQF, la comprensión de la organización cromosómica es la base para entender por qué las aberraciones del número o la estructura de los cromosomas causan enfermedades genéticas graves, por qué la inestabilidad genómica es un sello del cáncer, y por qué las técnicas citogenéticas como el cariotipo y el FISH tienen valor diagnóstico. El conocimiento del epigenoma —el conjunto de modificaciones que regulan la expresión

génica sin alterar la secuencia del ADN— es además fundamental para comprender enfermedades como el cáncer, los síndromes de impronta y las estrategias terapéuticas epigenéticas emergentes (Strachan & Read, 2019).

3.2 Objetivos de Aprendizaje

1. Describir los niveles de compactación del ADN, desde el nucleosoma hasta el cromosoma metafásico, identificando las estructuras y proteínas involucradas en cada nivel.

2. Explicar la estructura del nucleosoma y la función de las histonas, incluyendo el impacto de sus modificaciones postraduccionales sobre la expresión génica.

3. Identificar las principales regiones estructurales del cromosoma eucariota (centrómero, telómero, brazos) y su función biológica, incluyendo el patrón de bandas G.

4. Clasificar los elementos genéticos móviles (transposones de ADN y retrotransposones) y relacionarlos con la variabilidad genómica y la patología.

5. Relacionar la organización cromosómica con las aplicaciones diagnósticas de citogenética clínica (cariotipo, FISH) relevantes para el BQF.

6. Evaluar el rol de la metilación del ADN y de las modificaciones de histonas en el silenciamiento epigenético y en la patogénesis del cáncer.

Preguntas de Enfoque

1. ¿Por qué la misma información genética puede producir un hepatocito y una neurona si ambas células tienen exactamente el mismo ADN? ¿Qué papel juega la organización de la cromatina en esta diferencia?

2. ¿Cómo la metilación de las histonas o la acetilación de sus colas puede «activar» o «silenciar» genes sin cambiar la secuencia del ADN?

3. ¿Por qué la pérdida de la estructura telomérica se asocia con envejecimiento celular y cáncer?

4. ¿En qué se diferencia la transposición de tipo «cortar-y-pegar» de la retrotransposición en cuanto a su impacto sobre el genoma?

5. ¿Por qué un cromosoma en metafase es el mejor momento para obtener un cariotipo? ¿Qué información diagnóstica puede ofrecer el análisis de bandas G?

3.3 Cromatina: eucromatina, heterocromatina y epigenoma

La cromatina es el complejo de ADN, histonas y proteínas no histónicas que forma el contenido nuclear de las células eucariotas. No es una estructura homogénea: se distinguen dos estados con propiedades funcionales opuestas (Lewin et al., 2022):

Eucromatina: cromatina menos condensada, accesible a la maquinaria transcripcional; generalmente contiene genes activamente transcritos. Corresponde a las regiones claras en tinción de Giemsa (bandas R en la nomenclatura de Giemsa inverso).

Heterocromatina: cromatina muy condensada, transcripcionalmente silenciada. Se subdivide en:

***Heterocromatina constitutiva*:** siempre condensada; incluye regiones pericentroméricas, telómeros y gran parte del cromosoma Y. Rica en secuencias repetitivas (α-satélite, secuencias satélite). • *Heterocromatina facultativa*: puede cambiar entre estado activo e inactivo según el tipo celular o el estadio del desarrollo. El cromosoma X inactivo (corpúsculo de Barr) es el ejemplo paradigmático: en las células femeninas, uno de los dos cromosomas X es inactivado al azar

durante la embriogénesis temprana mediante la acción del ARN largo no codificante *XIST* (Strachan & Read, 2019).

Concepto Clave

La distinción entre eucromatina y heterocromatina no es permanente ni absoluta: el estado de la cromatina puede ser revertido por mecanismos epigenéticos. Esta plasticidad es fundamental para la diferenciación celular y es explotada por las células tumorales para silenciar genes supresores de tumores (Alberts et al., 2022).

3.3.1 Metilación del ADN y las islas CpG

Además de las modificaciones de histonas, el segundo pilar del epigenoma es la **metilación del ADN**, específicamente de citosinas en dinucleótidos **CpG** (5'-citosina-fosfatoguanina-3') (Bird, 2002). Las ADN metiltransferasas (dnmt) catalizan la adición de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina, generando 5-metilcitosina (5mC):

DNMT1: «metiltransferasa de mantenimiento»; copia el patrón de metilación de la cadena parental a la cadena recién sintetizada durante la replicación, asegurando la herencia epigenética generación tras generación.

DNMT3a y DNMT3b: «metiltransferasas de novo»; establecen nuevos patrones de metilación durante el desarrollo embrionario y la diferenciación celular. Sus mutaciones germinales causan el síndrome de Tatton-Brown-Rahman (DNMT3A) y la displasia inmuno-ósea de Schimke (DNMT3B).

Las **islas CpG** son regiones de ~300–3.000 pb con una densidad de CpG marcadamente superior a la media del genoma. El genoma humano tiene una frecuencia de CpG sorprendentemente baja porque la metilación de citosina facilita su desaminación espontánea a timina, erosionando los CpG a lo largo de la evolución. Aproximadamente el 60 % de los promotores génicos humanos están asociados a islas CpG. Cuando estas islas *no están metiladas*, el gen puede ser transcrito. Cuando se metilan aberrantemente —como ocurre en muchos tumores— el gen queda silenciado, incluso si su secuencia es normal (Bird, 2002).

¡Importante!

La hipermetilación aberrante de islas CpG en promotores de genes supresores de tumores (como *CDKN2A* que codifica p16, *MLH1* o *BRCA1*) es uno de los mecanismos epigenéticos más frecuentes de silenciamiento génico en el cáncer. Este mecanismo tiene relevancia terapéutica directa: los inhibidores de dnmt (azacitidina, decitabina) son fármacos aprobados que se incorporan al ADN e inactivan covalentemente las dnmt, restaurando la expresión de genes supresores silenciados epigenéticamente (Kumar et al., 2018).

3.4 Niveles de empaquetamiento del ADN

El camino del ADN libre al cromosoma metafásico se realiza en al menos cinco niveles jerárquicos de compactación, cada uno multiplicando el grado de condensación del anterior (Karp et al., 2019).

3.4.1 Nivel 1: El nucleosoma

El nucleosoma es la unidad básica de la cromatina. Consiste en:

Un **octámero de histonas**: 2 moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Aproximadamente **147 pares de bases** de ADN enrolladas 1.7 veces en torno al octámero. Una región de ADN **enlazante** (*linker*) de 20–60 pb entre nucleosomas consecutivos, con la que se asocia la histona H1 para compactar la fibra de 10 nm (Alberts et al., 2022).

La disposición de nucleosomas en el ADN produce la imagen de «cuentas en un collar» visible en microscopía electrónica. La estructura atómica del nucleosoma fue resuelta en 1997 por Luger y colaboradores mediante cristalografía de rayos X a 2,8 Å de resolución, revelando la geometría exacta del enrollamiento del ADN y la localización de las colas de histonas que sobresalen del núcleo y son sustratos de modificaciones epigenéticas (Lewin et al., 2022).

3.4.2 Nivel 2: La fibra de 30 nm (solenoide)

La unión de la histona H1 al ADN enlazante y la interacción entre nucleosomas adyacentes producen una fibra más compacta de 30 nm de diámetro, denominada **solenoide** o fibra de orden superior. Cada vuelta del solenoide contiene aproximadamente 6 nucleosomas. La existencia de esta fibra in vivo ha sido objeto de debate reciente: algunos estudios de criotomografía electrónica en células vivas sugieren mayor irregularidad estructural que la que los modelos

clásicos indicaban, pero la compactación mediada por H1 sobre la cromatina de 10 nm está bien establecida (Lodish et al., 2021).

3.4.3 Niveles 3–5: Dominios de bucle, cromátidas y cromosoma metafásico

La fibra de 30 nm se organiza en **dominios de bucle** (loops) anclados a una red proteica denominada **esqueleto cromosómico** o **eje central**. Cada dominio de bucle contiene 50,000–200,000 pb y forma una unidad de replicación y transcripción relativamente independiente. Estas unidades corresponden en gran medida a los **dominios de asociación topológica** (tad, *Topologically Associating Domains*) caracterizados por técnicas de captura de conformación cromosómica (Hi-C). Los bucles se compactan progresivamente hasta dar lugar a la cromátida y, finalmente, al **cromosoma metafásico** totalmente condensado, con un diámetro de 700 nm y un factor de compactación final de ∼10.000 respecto al ADN libre (Karp et al., 2019).

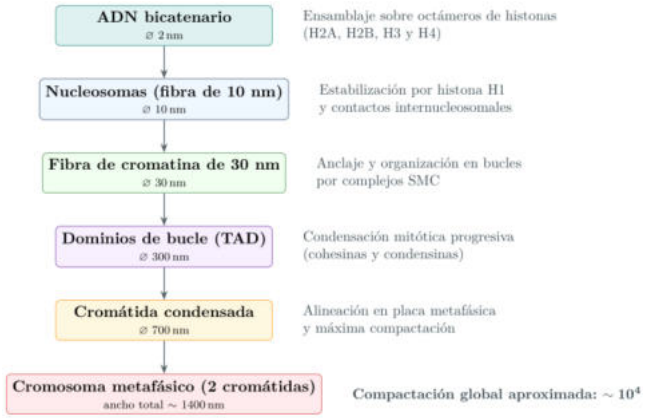


Figura 7. Jerarquía estructural de la compactación del ADN eucariota.

Esquema de la transición desde el ADN bicatenario (2 nm) hasta el cromosoma metafásico (700 nm), pasando por nucleosomas, fibra de 30 nm y dominios de bucle (TAD). A la derecha se resumen los complejos proteicos que favorecen cada nivel de organización. La compactación global alcanza aproximadamente $\sim 10^4$, lo que permite empaquetar el genoma en el núcleo y modular su accesibilidad funcional. SMC: *Structural Maintenance of Chromosomes*; TAD: *Topologically Associating Domain*. Elaboración propia basada en Alberts et al. (2022) y Karp et al. (2019).

3.4.4 Variantes de histonas y su rol funcional

Además de las histonas canónicas, existen **variantes de histonas** con funciones especializadas, expresadas en momentos específicos del ciclo celular o en loci genéticos particulares (Lewin et al., 2022):

H3.3: variante de H3 que se incorpora a la cromatina de manera independiente de la replicación, predominantemente en genes activamente transcritos y regiones reguladoras. Marca cromatina

«activa» y es importante en células pluripotentes. **CENP-A** (también llamada CenH3): variante de H3 presente exclusivamente en los nucleosomas centroméricos; es esencial para el ensamblaje del cinetocoro y la correcta segregación cromosómica. Mutaciones en *CENPA* se asocian con aneuploidías. **H2A.X**: variante de H2A que, cuando se fosforila en la serina 139 (generando *γ***H2AX**), señaliza la presencia de roturas de doble cadena del ADN. La detección de *γ*H2AX por inmunocitoquímica o citometría de flujo se usa como ensayo estándar de daño al ADN en estudios de genotoxicidad y monitorización de quimioterapia (Alberts et al., 2022). **H2A.Z**: enriquecida en regiones de transición entre eucromatina y heterocromatina; participa en la regulación de la expresión génica y en la estabilidad del genoma.

3.5 Histonas: modificaciones y remodelación de la cromatina

Las histonas son proteínas básicas (ricas en lisina y arginina) que interactúan electrostáticamente con el ADN cargado negativamente. Las histonas del core del nucleosoma (H2A, H2B, H3, H4) son altamente conservadas evolutivamente: H4 de guisante y H4 humana difieren en solo 2 aminoácidos de 102, lo que refleja la presión evolutiva extrema sobre su función (Lewin et al., 2022).

3.5.1 Modificaciones postraduccionales de las colas de histonas

Cada histona del núcleo tiene una **cola N-terminal** que sobresale del nucleosoma y puede recibir diversas **modificaciones covalentes postraduccionales**:

Acetilación (en lisinas): realizada por histona-acetiltransferasas (hat); neutraliza la carga positiva de la lisina, debilitando la interacción histona-ADN y *activando* la transcripción. Es revertida por histona-desacetilasas (hdac). **Metilación** (en lisinas y argininas): puede activar o silenciar, según el residuo y el grado de metilación. Ej.: H3K4me3 (trimetilación de H3 en Lys4) es una marca de *activación* de promotores; H3K9me3 y H3K27me3 son marcas de *silenciamiento* (Alberts et al., 2022).

Fosforilación (en serinas y treoninas): H3 Ser10-P se asocia con condensación cromosómica mitótica; *γ*H2AX (H2AX Ser139-P) señaliza roturas de doble cadena.

Ubiquitinación (en lisinas): H2BK120ub1 activa la transcripción; H2AK119ub1 (catalizada por el complejo Polycomb PRC1) reprime genes del desarrollo.

El conjunto de estas modificaciones forma el llamado **código de histonas**, un lenguaje epigenético que las células utilizan para «recordar» qué genes deben estar activos o silenciados sin cambiar la secuencia del ADN (Strachan & Read, 2019).

Tabla 7. Principales modificaciones de histonas y su efecto sobre la expresión génica.

Modificación	Sitio	Enzima escritora	Efecto funcional
Acetilación	H3K9ac, H4K16ac	HAT (p300, CBP)	Activación transcripcional
Metilación (me3)	H3K4me3	SET1/MLL	Promotores activos
Metilación (me3)	H3K9me3	SUV39H1	Heterocromatina

			constitutiva
Metilación (me3)	H3K27me3	EZH2 (complejo PRC2)	Silenciamiento Polycomb
Fosforilación	H3 Ser10-P	Aurora B kinasa	Condensación cromosómica mitótica
Fosforilación	H2AX Ser139-P (γH2AX)	ATM / ATR	Señal de DSB del ADN
Ubiquitinación	H2BK120ub1	RNF20/RNF40	Activación; elongación
Ubiquitinación	H2AK119ub1	PRC1	Represión génica

Fuente: Alberts et al. (2022) y Lewin et al. (2022).

Nota. HAT: histona-acetiltransferasa; DSB: doble rotura de cadena del ADN; PRC1/2: *Polycomb Repressive Complex* 1/2.

3.5.2 Inhibidores de enzimas epigenéticas: terapia epigenética

La reversibilidad de las modificaciones de histonas hace que las enzimas epigenéticas sean dianas terapéuticas atractivas. A diferencia de las mutaciones genéticas, las alteraciones epigenéticas pueden ser revertidas farmacológicamente (Kumar et al., 2018):

Inhibidores de HDAC (HDACi): el vorinostat (SAHA) y el romidepsina bloquean la remoción de grupos acetilo de las histonas, manteniendo la cromatina en estado abierto y reactivando genes silenciados en células tumorales. Aprobados para linfoma cutáneo de células T.

Inhibidores de EZH2: el tazemetostat inhibe la metiltransferasa EZH2 (responsable de H3K27me3), bloqueando el silenciamiento

Polycomb; aprobado para sarcoma epitelioide con pérdida de *SMARCB1*.

Inhibidores de BET: los bromodominios (lectores de acetilación de histonas) son inhibidos por compuestos como JQ1, bloqueando la transcripción de oncogenes como *MYC*; en ensayos clínicos para leucemias y linfomas.

Inhibidores de LSD1 (KDM1A): bloquean la desmetilación de H3K4me1/2, desestabilizando el estado de cromatina de células madre leucémicas.

Para el BQF, la relevancia práctica de estos fármacos incluye el conocimiento de sus mecanismos para informar en la dispensación y el monitoreo de toxicidad (mielosupresión, fatiga). Los perfiles epigenómicos de pacientes pueden predecir la respuesta a HDACi mediante análisis de secuenciación de cromatina accesible (atac-seq) (Strachan & Read, 2019).

3.5.3 Complejos de remodelación de la cromatina dependientes de ATP

Las modificaciones de histonas operan en coordinación con los **complejos de remodelación de la cromatina dependientes de** atp, enzimas que utilizan la hidrólisis del atp para reposicionar, reconfigurar o expulsar nucleosomas. Los principales grupos son (Karp et al., 2019):

SWI/SNF (*Switch/Sucrose NonFermenting*): desliza o desplaza nucleosomas

para abrir regiones promotoras. El gen *SMARCA4*/BRG1 —subunidad catalítica de SWI/SNF— es un supresor tumoral mutado con alta frecuencia en carcinoma de ovario de células pequeñas, carcinoma de pulmón y otros tumores.

ISWI (*Imitation SWI*): redistribuye nucleosomas de manera regular para compactar la cromatina; participa en la replicación del ADN y el silenciamiento.

CHD (*Chromodomain Helicase DNA-binding*): reconoce marcas de metilación de histonas para posicionar nucleosomas durante el desarrollo. *CHD7* está mutado en el síndrome charge (coloboma, cardiopatía, atresia de coanas, retraso del crecimiento, anomalías genitales y auriculares) (Strachan & Read, 2019).

INO80: participa en la reparación del ADN e intercambia la variante H2A.Z.

3.6 Estructura del cromosoma eucariota y citogenética

Los cromosomas humanos son estructuras altamente organizadas con regiones funcionales específicas (Turnpenny et al., 2022). El estudio morfológico y molecular de los cromosomas —la **citogenética**— es una herramienta diagnóstica central en genética médica, oncología y diagnóstico prenatal.

3.6.1 Regiones estructurales del cromosoma

Centrómero: región formada principalmente por secuencias de ADN repetitivas (α-satélite en humanos, unidades de 171 pb en tándem). Es

el punto de anclaje del cinetocoro y de los microtúbulos del huso mitótico. La no disyunción en el centrómero durante la meiosis produce aneuploidías (Nussbaum et al., 2016).

Telómeros: regiones terminales formadas por miles de repeticiones de la secuencia TTAGGG, asociadas al complejo protector **shelterina** (TRF1, TRF2, POT1, TPP1, TIN2, RAP1). Sus funciones incluyen: proteger los extremos de degradación nucleolítica y de fusiones cromosómicas, y resolver el «problema de la replicación del extremo» mediante la telomerasa (Lodish et al., 2021).

Brazos cromosómicos: brazo corto (**p**, del francés *petit*) y brazo largo (**q**, del francés *queue*) a cada lado del centrómero. Según la posición del centrómero, los cromosomas son metacéntricos, submetacéntricos, acrocéntricos o telocéntricos.

Regiones NOR (*Nucleolar Organizer Regions*): en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos 13, 14, 15, 21 y 22; contienen los genes del ARN ribosómico 28S, 18S y 5.8S; forman el nucléolo.

¡Importante!

La telomerasa está inactiva en la mayoría de las células somáticas adultas, lo que conduce al acortamiento progresivo de los telómeros con cada división celular —un mecanismo natural anti-proliferativo. En las células cancerosas, la telomerasa se reactiva en ∼90 % de los casos, permitiendo una proliferación ilimitada. El acortamiento telomérico acelerado se asocia también con síndromes de

envejecimiento prematuro como la disqueratosis congénita, causada por mutaciones en componentes

de la telomerasa (*TERC*, *TERT*, *DKC1*) (Kumar et al., 2018).

3.6.2 Bandas cromosómicas y cariotipo

La técnica de **bandeo G** (tinción con colorante de Giemsa tras digestión con tripsina) produce un patrón alternado de bandas oscuras y claras que permite identificar cada cromosoma de manera inequívoca. Con preparaciones de alta calidad se pueden resolver 400–850 bandas por juego haploide (Turnpenny et al., 2022):

Bandas G oscuras: regiones ricas en at, condensadas, de replicación tardía, con menor densidad génica. Corresponden a heterocromatina. **Bandas G claras** (bandas R en tinción inversa): regiones ricas en gc, de replicación temprana, con mayor densidad de genes. Corresponden a eucromatina activa.

La **nomenclatura** iscn (*International System for Human Cytogenomic Nomenclature*) asigna a cada banda una dirección cromosómica: número de cromosoma + brazo (p/q) + número de región + número de banda. Por ejemplo: 7q11.23 indica cromosoma 7, brazo largo, región 1, banda 1, sub-banda 23 —la región delecionada en el síndrome de Williams (Nussbaum et al., 2016).

Cromosoma submetacéntrico

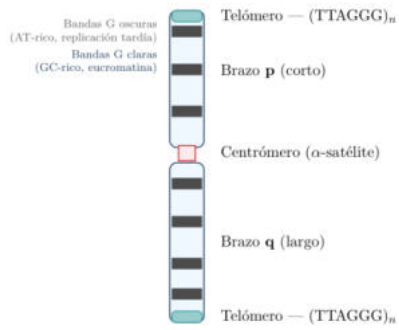


Figura 8. Estructura esquemática de un cromosoma submetacéntrico humano con patrón de bandas G.

Se indican las regiones teloméricas (teal), el centrómero (rojo), los brazos p y q, y el patrón de bandas G (oscuras: AT-ricas, heterocromatina; claras: GCricas, eucromatina activa). La nomenclatura ISCN localiza cada banda con el formato: cromosoma + brazo + región + banda. Elaboración propia basada en Turnpenny et al. (2022).

Tabla 8. Componentes estructurales del cromosoma eucariota y su relevancia clínica.

Componente	Función principal	Relevancia clínica
Centrómero (α-satélite)	Unión del cinetocoro; segregación	No disyunción →aneuploidías
Telómero (TTAGGG)n	Protección del extremo cromosómico	Acortamiento →envejecimiento; cáncer
Brazo corto (p)	Información génica	Microdeleción →síndromes específicos
Brazo largo (q)	Información génica	Translocaciones →leucemias
Región NOR (brazos p 13–22)	Transcripción de ARNr	Polimorfismos; diagnóstico prenatal

Bandas G (patrón)	Identificación citogenética	Base del cariotipo y del bandeo G/Q/R

Fuente: Turnpenny et al. (2022) y Nussbaum et al. (2016).

Nota. ARNr: ARN ribosómico; NOR: *Nucleolar Organizer Region*.

En el Laboratorio

Hibridación fluorescente in situ (FISH) — protocolo y aplicaciones
Fundamento: La FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) utiliza sondas de ADN marcadas con fluorocromos para detectar secuencias específicas del genoma sobre cromosomas metafásicos o núcleos en interfase. **Protocolo general:**

1. **Preparación de la muestra**: extensión de metafases sobre portaobjetos (a partir de linfocitos estimulados con fitohemaglutinina) o núcleos en interfase de tejido tumoral fijado con formalina e incluido en parafina (ffpe).

2. **Desnaturalización**: los cromosomas se calientan a 73 ^(◦)C en formamida al 70 %/2× SSC durante 2 min, separando las dos cadenas del ADN.

3. **Hibridación**: se aplica la sonda marcada a 37 ^(◦)C durante 8–16 horas; la sonda se hibrida específicamente con su secuencia complementaria en el cromosoma.

4. **Lavado y detección**: se eliminan las sondas no hibridadas; se contratiñen los núcleos con DAPI (azul); se visualizan en microscopio de fluorescencia.

Tipos de sondas y aplicaciones diagnósticas:

Locus-específicas: sonda BCR-ABL para detectar t(9;22) en leucemia mieloide crónica; sonda MYCN para amplificación en neuroblastoma; sonda HER2 para amplificación en cáncer de mama.

Centroméricas: detectan número de cromosomas específicos; útiles para diagnóstico rápido de trisomías en líquido amniótico (aneuploidías cromosomas 13, 18, 21, X, Y).

Pintado cromosómico: colorean todo un cromosoma para detectar translocaciones crípticas no visibles en cariotipo convencional.

Interpretación para el BQF: En un núcleo en interfase normal se observan 2 señales por cromosoma. Una señal adicional indica amplificación o trisomía; ausencia de señal indica deleción o monosomía. Las sondas de fusión (dos colores distintos) muestran translocación cuando ambas señales colocalizan.

3.7 Genoma humano: composición y secuencias repetitivas

El genoma humano haploide contiene ∼3,2 × 10^9 pb distribuidos en 23 cromosomas, pero solo el ∼1.5 % corresponde a secuencias codificantes de proteínas. El Proyecto ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*), completado en 2012, reveló que más del **80 %** del genoma tiene alguna función bioquímica —como señal reguladora, sitio de unión a proteínas, o región de transcripción de ARN no codificante— aunque el debate sobre la proporción de función biológica «causal» continúa (Strachan & Read, 2019).

La organización tridimensional del genoma en el núcleo es igualmente funcional. Los cromosomas no flotan libremente en el núcleo, sino que ocupan **territorios cromosómicos** definidos, con los cromosomas activos tendiendo a localizarse hacia el interior nuclear y los inactivos hacia la periferia laminar. Dentro de cada cromosoma, los tads separan dominios reguladores activos de silenciados, de manera que los enhancers solo contactan con los promotores dentro del mismo dominio. Las mutaciones en los elementos aisladores (*insulators*, como los sitios de unión de ctcf) pueden reconfigurar los límites de los tads y provocar la activación aberrante de oncogenes adyacentes, un mecanismo de «enhancer hijacking» documentado en leucemias y tumores sólidos (Alberts et al., 2022).

Genes codificantes de proteínas: ∼20.000–25.000 genes; ∼1.5 % del genoma. **ARN no codificantes**: genes de ARNr, ARNt, miARN, snARN, lncARN; ∼5 % adicional del genoma.

Regiones reguladoras: promotores, *enhancers*, *silencers*, aisladores; identificados por sus marcas epigenéticas (H3K4me1 para enhancers; H3K4me3 para promotores activos).

Secuencias repetitivas en tándem: microsatélites (str), minisatélites (vntr), macrosatélites; ∼10 % del genoma. **Elementos transponibles**: ∼45 % del genoma humano (Alberts et al., 2022).

3.7.1 Impronta genómica y metilación diferencial

Un caso paradigmático de la función de la metilación del ADN es la **impronta genómica** (*genomic imprinting*): el fenómeno por el cual

ciertos genes se expresan monoalelicamente según el progenitor de origen. Los genes improntados llevan marcas epigenéticas —principalmente metilación de ADN y modificaciones de histonas— establecidas en la línea germinal que definen si el alelo materno o el paterno será activo en el individuo (Strachan & Read, 2019):

Síndrome de Prader-Willi: causado por pérdida de función de genes paternos en 15q11-q13 (por deleción paterna, disomía uniparental materna, o defecto del imprinting). Fenotipo: hipotonía neonatal, hiperfagia, obesidad, hipogonadismo y discapacidad intelectual leve.

Síndrome de Angelman: causado por pérdida de función del gen *UBE3A* materno en la misma región 15q11-q13 (el alelo paterno está silenciado por imprinting en neuronas). Fenotipo: discapacidad intelectual severa, convulsiones, movimientos atáxicos y conducta característica de «marioneta feliz».

Síndrome de Beckwith-Wiedemann: causado por alteraciones en el imprinting de la región 11p15.5, con sobreexpresión del factor de crecimiento IGF2. Fenotipo: sobrecrecimiento, macroglosia, predisposición a tumor de Wilms.

La correcta interpretación de estas entidades requiere distinguir entre el análisis genético (secuencia del gen) y el análisis epigenético (estado de metilación del locus improntado), siendo el BQF un profesional clave en la validación técnica de los ensayos de metilación específica por PCR (MS-PCR) o de pirosecuenciación bisulfito que se emplean en estos diagnósticos (Nussbaum et al., 2016).

¿Sabías que. . . ?

El Proyecto del Genoma Humano (pgh) fue declarado «sustancialmente completo» en abril de 2003. Sin embargo, existían regiones centroméricas y teloméricas con secuencias muy repetitivas que resistían el ensamblaje. En 2022, el consorcio T2T (*Telomere-to-Telomere*) publicó la primera secuencia verdaderamente completa del genoma humano, revelando más de 200 Mb de nueva secuencia —principalmente en heterocromatina constitutiva—, nuevas familias de secuencias repetitivas y una revisión del número de genes codificantes de proteínas (Collins et al., 2003).

Concepto Clave

El genoma humano no es una entidad bidimensional estática, sino una estructura tridimensional dinámica en el núcleo. La organización en territorios cromosómicos, dominios TAD y bucles reguladores determina qué genes pueden ser activados por qué enhancers. Las enfermedades causadas por «enhancer hijacking» —reconfiguración de los límites TAD que permite la activación aberrante de proto-oncogenes— ilustran que no es suficiente secuenciar el genoma: también es necesario conocer su organización espacial y epigenómica para comprender la patología molecular (Alberts et al., 2022).

3.8 Elementos genéticos móviles: transposones y retrotransposones

Los elementos genéticos móviles, también llamados **transposones** o *transposable elements* (te), son secuencias de ADN capaces de

moverse de un lugar a otro dentro del genoma. Fueron descubiertos por Barbara McClintock en maíz en la década de 1940 (Premio Nobel, 1983) (Lewin et al., 2022). Representan colectivamente ∼45 % del genoma humano y han sido cruciales en la evolución genómica.

3.8.1 Transposones de ADN (clase II): mecanismo cortar-ypegar

Los transposones de ADN se desplazan mediante un mecanismo de **«cortar-y-pegar»** (*cut and paste*):

1. La **transposasa** (codificada por el propio transposón) reconoce las **secuencias de repetición terminal invertida** (tir) que flanquean el transposón.

2. La transposasa corta el transposón de su sitio original mediante escisión de ambas cadenas del ADN.

3. El fragmento de ADN se inserta en una nueva localización del genoma.

4. El sitio original queda con una doble rotura de cadena que debe ser reparada —frecuentemente por nhej, lo que puede introducir pequeñas inserciones o deleciones (Karp et al., 2019).

Este mecanismo *no aumenta* el número de copias del transposón a menos que la transposición ocurra justo después de la replicación del transposón pero antes de la del sitio de inserción.

3.8.2 Retrotransposones (clase I): mecanismo copiar-y-pegar

Los retrotransposones se desplazan mediante un mecanismo de **«copiar-y-pegar»** (*copy and paste*) que requiere un intermediario de ARN:

1. El retrotransposón se transcribe por la ARN polimerasa II celular a un ARN intermediario.

2. Una **transcriptasa inversa** (codificada por el retrotransposón) sintetiza ADN bicatenario a partir del ARN intermediario.

3. El nuevo ADN se integra en una nueva localización del genoma mediante una endonucleasa específica.

4. El retrotransposón original permanece en su lugar →el genoma *aumenta en número de copias* con cada ciclo de retrotransposición.

Se subdividen en:

LTR-retrotransposones: similares en estructura a los retrovirus; incluyen los retrovirus endógenos humanos (herv); representan ∼8 % del genoma humano. **Elementos LINE** (*Long Interspersed Nuclear Elements*): LINE-1 es el más activo en humanos; ∼500.000 copias, ∼17 % del genoma humano; codifica ORF1p (proteína de unión al ARN) y ORF2p (transcriptasa inversa + endonucleasa).

Elementos SINE (*Short Interspersed Nuclear Elements*): incluyen los *Alu* (∼1.1 millones de copias, ∼11 % del genoma humano); parasitan la maquinaria de LINE-1 para su retrotransposición (Strachan & Read, 2019).

3.8.3 Silenciamiento de elementos móviles y su evasión en el cáncer

La célula mantiene la mayoría de los elementos transponibles silenciados mediante mecanismos epigenéticos (Strachan & Read, 2019):

Metilación del ADN: las islas CpG en los promotores de LINE-1 y herv están constitutivamente metiladas en células somáticas normales.

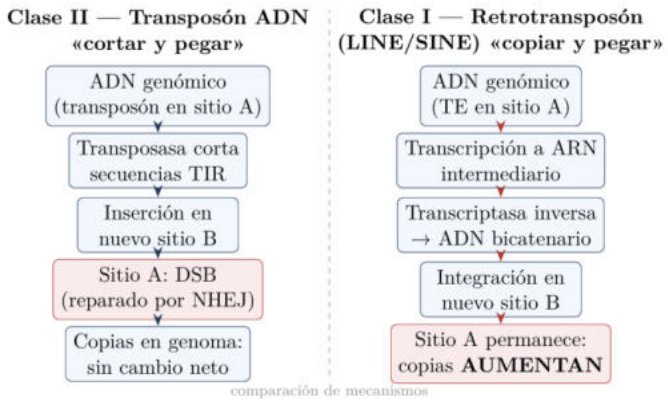


Figura 9. Comparación de mecanismos de transposición de clase I y clase II.

Los transposones de ADN (izquierda) utilizan un mecanismo de escisión e inserción que no aumenta el número de copias en el genoma. Los retrotransposones (derecha) utilizan un intermediario de ARN que resulta en aumento neto de copias. DSB: rotura de doble cadena; NHEJ: *Non-Homologous End Joining*; TIR: secuencias de repetición terminal invertida. Elaboración propia basada en Karp et al. (2019) y Lewin et al. (2022).

Vía PIWI-piARN: en células germinales, los ARN pequeños asociados a PIWI (piARN) degradan los transcritos de elementos transponibles antes de que puedan retrotransponerse.

Marcas represivas de histonas: H3K9me3 en las regiones de los te los mantiene en heterocromatina silenciada.

En el cáncer, la hipometilación global del genoma —especialmente de los LINE-1— permite la reactivación de elementos transponibles, contribuyendo a la inestabilidad genómica, mutagénesis insertional, y generación de ARN bicatenario que puede activar respuestas inmunitarias innatas (Kumar et al., 2018).

3.8.4 Significado biológico de los elementos móviles

Los elementos transponibles no son «basura genómica» sino factores moldeadores de los genomas:

Exaptación evolutiva: secuencias de te han sido reclutadas para funciones celulares. Ejemplo: la recombinasa RAG1/RAG2, que genera la diversidad de anticuerpos y receptores de células T, evolucionó a partir de una transposasa.

Inestabilidad genómica en enfermedad: inserción de LINE-1 en el gen *F8* causa hemofilia A; inserción en *DMD* causa distrofia muscular de Duchenne.

Recombinación homóloga anómala: elementos *Alu* median deleciones patogénicas —síndrome de Williams (del 7q11.23), síndrome de DiGeorge (del 22q11.2).

Cáncer: reactivación de LINE-1 contribuye a inestabilidad genómica tumoral (Kumar et al., 2018).

3.8.5 Técnicas de análisis del epigenoma: ChIP-seq y ATACseq

El estudio sistemático del epigenoma requiere técnicas de alto rendimiento capaces de mapear modificaciones de histonas, metilación del ADN y accesibilidad de la cromatina a escala genómica (Mardis, 2011):

ChIP-seq (*Chromatin Immunoprecipitation* + secuenciación): combina la inmunoprecipitación de cromatina con un anticuerpo específico contra una modificación de histona (p.ej., anti-H3K4me3) con la secuenciación masiva del ADN recuperado. Permite mapear la distribución genómica de cualquier marca de histona o factor de transcripción. Aplicación diagnóstica: perfiles de H3K27ac como mapa de enhancers activos en tumores primarios; predicción de respuesta a inhibidores de BET.

ATAC-seq (*Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing*): utiliza la transposasa Tn5 para insertar adaptadores de secuenciación selectivamente en regiones de cromatina abierta (nucleosoma-libre). Genera un mapa de accesibilidad genómica que revela promotores y enhancers activos. Ventaja clave: requiere muy poco material de partida (puede realizarse en células únicas), lo que lo hace idóneo para biopsias tumorales pequeñas.

Secuenciación bisulfito: el tratamiento con bisulfito convierte las citosinas no metiladas en uracilos, pero protege las 5-metilcitosinas.

Tras la secuenciación, la comparación permite mapear la metilación a resolución de nucleótido único. La versión de alto rendimiento (WGBS, *Whole Genome Bisulfite Sequencing*) genera mapas completos de metilación del genoma. A menor escala, la MS-PCR específica de metilación es la prueba de rutina para diagnosticar síndromes de imprinting en el laboratorio clínico (Strachan & Read, 2019).

Para el BQF, la relevancia de estas técnicas radica en: (1) la validación de ensayos de metilación para diagnóstico de síndromes de imprinting; (2) la interpretación de informes de secuenciación de nueva generación que incluyen datos epigenómicos en oncología de precisión; (3) el control de calidad de muestras ffpe para análisis epigenéticos, donde la fragmentación del ADN es un factor crítico.

Aplicación para el Bioquímico Farmacéutico

La variabilidad de los microsatélites y de los elementos repetitivos del genoma humano es la base del análisis de str (*Short Tandem Repeats*) utilizado en:

Medicina forense: identificación individual a partir de muestras de ADN. **Diagnóstico de paternidad**: comparación de perfiles de str entre presunto padre e hijo.

Diagnóstico de inestabilidad de microsatélites (MSI): marcador de deficiencia en reparación de emparejamientos erróneos (mmr); relevante en síndrome de Lynch y cáncer colorrectal hereditario; predictor de respuesta a inmunoterapia.

Quimerismo post-trasplante: los perfiles de str del donante y receptor permiten monitorizar el injerto en trasplante de médula ósea.

El BQF puede participar activamente en la realización e interpretación de estos análisis en laboratorios de genómica clínica y genética forense (Strachan & Read, 2019).

Caso Clínico

Situación: Una mujer de 32 años, portadora conocida de hemofilia A severa ligada al X, está en su primera gestación. El médico solicita diagnóstico genético preimplantacional (dgp) y, en paralelo, un análisis de su propio genoma para confirmar el estado de portadora. El laboratorio determina que la causa de la hemofilia A en su familia es una inserción de un elemento line-1 en el exón 14 del gen *F8*, evento de novo que ocurrió hace dos generaciones.

Preguntas para el análisis:

1. ¿Por qué la inserción de un elemento transponible en un exón del gen *F8* puede causar hemofilia?

2. ¿Qué diferencia existe entre un transposón de ADN y un elemento line-1 en cuanto al mecanismo de transposición y el impacto sobre el genoma?

3. ¿Qué prueba molecular podría confirmar la presencia de esta inserción específica en los embriones del dgp?

La organización del genoma en cromatina y cromosomas provee el contexto estructural para los procesos moleculares que se estudiarán en

el capítulo 4: la replicación del ADN, la transcripción y la traducción —los tres procesos del dogma central— requieren que la cromatina sea suficientemente accesible para que las polimerasas correspondientes puedan actuar.

Conceptos Clave

***α*-satélite** Secuencia repetitiva de 171 pb que forma el ADN centromérico en humanos; base de la heterocromatina constitutiva pericentromérica y sustrato para el ensamblaje del cinetocoro mediante la variante de histona CENP-A.

Banda G Región cromosómica identificada por tinción de Giemsa tras digestión con tripsina; bandas oscuras corresponden a heterocromatina AT-rica; bandas claras corresponden a eucromatina GC-rica con mayor densidad génica.

CENP-A Variante de la histona H3 presente exclusivamente en los nucleosomas centroméricos; esencial para el ensamblaje del cinetocoro y la correcta segregación cromosómica.

Código de histonas Combinación de modificaciones postraduccionales en las colas N-terminales de las histonas (acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación) que actúa como lenguaje epigenético para regular la transcripción génica.

Complejo de remodelación de cromatina Enzima dependiente de ATP (SWI/SNF, ISWI, CHD) que repositiona o expulsa nucleosomas para regular el acceso de la maquinaria transcripcional o replicativa al ADN.

CpG (Isla CpG) Dinucleótido 5’-citosina-fosfato-guanina-3’; las islas CpG son regiones de alta densidad de CpG en promotores; su metilación por DNMT silencia el gen asociado; la hipermetilación aberrante es un mecanismo epigenético de silenciamiento de supresores tumorales en el cáncer.

Elemento Alu SINE más abundante en el genoma humano (∼1,1 millones de copias, 11 % del genoma); media recombinaciones homólogas anómalas y síndromes de deleción.

FISH *Fluorescence In Situ Hybridization*; técnica de hibridación de sondas fluorescentes sobre cromosomas o núcleos para detectar translocaciones, amplificaciones o deleciones submicroscópicas de relevancia diagnóstica.

Heterocromatina facultativa Cromatina que puede cambiar entre estado activo e inactivo según el tipo celular; ejemplo: cromosoma X inactivo (corpúsculo de Barr) en células femeninas.

ISCN *International System for Human Cytogenomic Nomenclature*; sistema estandarizado para describir cariotipos y anomalías cromosómicas, incluyendo número de cromosomas, sexo cromosómico y aberraciones estructurales.

LINE-1 (L1) Retrotransposón de cadena larga activo en el genoma humano (∼17 %); codifica transcriptasa inversa y endonucleasa; puede causar mutaciones por inserción en genes funcionales.

Nucleosoma Unidad básica de la cromatina; octámero de histonas (H2A, H2B, H3, H4) con 147 pb de ADN enrollado; responsable del primer nivel de compactación del ADN.

Shelterina Complejo proteico de seis subunidades (TRF1, TRF2, POT1, TPP1, TIN2, RAP1) que recubre los telómeros y los protege de la degradación nucleolítica y activación del checkpoint de daño al ADN.

Solenoide Fibra de cromatina de 30 nm formada por el enrollamiento de nucleosomas mediado por la histona H1; segundo nivel de compactación del ADN.

*γ***H2AX** Forma fosforilada de la variante de histona H2AX en la serina 139; señal de rotura de doble cadena del ADN; usada como biomarcador de daño genotóxico y respuesta a quimioterapia.

Actividades de Consolidación

1. **Modelado de nucleosoma y solenoide.** En grupos, modelen un nucleosoma usando materiales de bajo costo: una pelota de espuma para el octámero de histonas y una cuerda para el ADN. Enrollen la cuerda 1,7 veces alrededor de la pelota, representando los 147 pb. Luego armen 6 nucleosomas consecutivos y compáctelos

en una estructura helicoidal para representar el solenoide. Discutan: ¿cómo la acetilación de las histonas podría «aflojar» el nucleosoma y qué implicaciones tiene esto para la transcripción de genes supresores tumorales?

2. **Análisis de composición genómica.** Utilizando los datos del Proyecto del Genoma Humano: el genoma humano tiene ~3.200 Mb y contiene ~20.000–25.000 genes. Calculen qué porcentaje del genoma corresponde a: (a) secuencias codificantes (~1,5 %); (b) elementos repetitivos (~45 %); (c) regiones reguladoras (estimado ENCODE: >80 % con función bioquímica). ¿Qué inferencias pueden hacer sobre la función del ADN «no codificante»?

3. **Discusión: telómeros, cáncer y terapia.** Lean la caja de «Alerta Importante» sobre telomerasa y cáncer. En grupos, discutan: ¿es la inhibición de la telomerasa una estrategia terapéutica ideal? ¿Qué efectos secundarios podría tener sobre células germinales y el sistema inmune? ¿Por qué el acortamiento telomérico en células normales puede considerarse tanto un mecanismo anti-tumoral como pro-envejecimiento? Elaboren una propuesta de criterios para seleccionar pacientes candidatos a terapia anti-telomerasa.

4. **Caso LINE-1 y hemofilia.** Con base en el caso clínico presentado, investiguen en la base de datos ClinVar o OMIM casos documentados de hemofilia A causada por inserción de elementos transponibles. ¿Qué técnica molecular elegirían para confirmar la inserción específica en los embriones del DGP? Redacten un informe breve con justificación técnica.

3.9 Preguntas de Autoevaluación

A. Opción múltiple

1. ¿Cuántos pares de bases de ADN se enrollan alrededor del octámero de histonas en un nucleosoma?

(a) 200

(b) **147**

(c) 300

(d) 30

2. La modificación de histonas que se asocia más consistentemente con la activación transcripcional es:

(a) Metilación de H3K9 (me3)

(b) **Acetilación de colas de histonas**

(c) Fosforilación de H3 Ser10

(d) Ubiquitinación de H2AK119

3. El telómero humano está formado por repeticiones en tándem de la secuencia:

(a) AATAAA

(b) CCCCAA

(c) **TTAGGG**

(d) AAATTT

4. Los elementos Alu son:

(a) Transposones de ADN de la clase II

(b) **SINEs (retrotransposones cortos) abundantes en el genoma humano**

(c) Secuencias del centrómero (α-satélite)

(d) Repeticiones teloméricas

5. El mecanismo de movilización de los retrotransposones requiere obligatoriamente:

(a) Una transposasa que corta el ADN

(b) Solo proteínas del huésped sin intermediario

(c) **Un intermediario de ARN y una transcriptasa inversa**

(d) Una topoisomerasa tipo II

6. La hipermetilación aberrante de islas CpG en promotores de genes supresores tumorales produce:

(a) Activación de la transcripción del gen supresor

(b) Mutaciones puntuales en la secuencia del ADN

(c) **Silenciamiento epigenético del gen sin alterar su secuencia**

(d) Inestabilidad cromosómica por no disyunción

7. La variante de histona γH2AX se genera cuando:

(a) La histona H1 es acetilada durante la transcripción

(b) **La histona H2AX es fosforilada en Ser139 en respuesta a roturas de doble cadena**

(c) DNMT3a metila el nucleosoma durante la diferenciación celular

(d) El complejo SWI/SNF remodela la cromatina en promotores activos

8. Un cariotipo con la fórmula 47,XY,+21 corresponde a:

(a) Síndrome de Turner (monosomía X)

(b) Triploidía completa

(c) **Síndrome de Down (trisomía 21) en varón**

(d) Translocación Robertsoniana

B. Verdadero o Falso — justifique su respuesta

1. «La heterocromatina facultativa nunca puede convertirse en eucromatina porque su condensación es irreversible.» *Falso.* La heterocromatina facultativa —como el cromosoma X inactivo— puede en principio ser reactivada mediante reprogramación epigenética, como ocurre en la generación de células iPS (pluripotentes inducidas). La «irreversibilidad» de la heterocromatina constitutiva (p.ej., pericentromérica) es mucho mayor que la de la facultativa.

2. «Un gen cuya isla CpG promotora está hipermetilada producirá una proteína truncada.» *Falso.* La hipermetilación de la isla CpG silencia la transcripción del gen, pero la secuencia codificante permanece intacta. No se produce proteína, no una proteína truncada. La truncación implica mutaciones en la secuencia (frameshift, stop prematuro), no silenciamiento epigenético.

3. «La variante de histona CENP-A puede sustituir funcionalmente a H3.3 en la regulación de genes activos.» *Falso.* CENP-A y H3.3 son variantes de H3 con funciones completamente distintas y distribuciones complementarias: CENP-A se localiza exclusivamente en los centrómeros y es esencial para el ensamblaje del cinetocoro, mientras que H3.3 se enriquece en genes activamente transcritos y enhancers. No son intercambiables funcionalmente.

C. Análisis de Casos

1. Un paciente de 2 años es referido con hipotonía severa, hiperfagia y genitales pequeños. El cariotipo convencional es 46,XY. El análisis de MS-PCR para la región 15q11-q13 muestra ausencia de metilación en el alelo materno (solo el patrón paterno es detectable). ¿Cuál es el diagnóstico más probable? ¿Qué mecanismo epigenético explica el cuadro clínico? ¿Qué prueba de segunda línea confirmaría si la causa es una deleción, disomía uniparental o un defecto del centro de imprinting?

2. En un laboratorio de genómica oncológica se analiza la cromatina de células de carcinoma colorrectal con deficiencia de mmr. Se detecta hipometilación global del genoma, hipermetilación de la isla CpG del

promotor de *MLH1*, y señales aberrantes de FISH para el locus *CDH1*. El patólogo pregunta si el tumor presenta «fenotipo CIMP» (*CpG Island Methylator Phenotype*). Explique qué es el fenotipo CIMP, cómo se detecta en el laboratorio y qué implicaciones pronósticas y terapéuticas tiene para el paciente.

D. Preguntas de desarrollo

1. Explica el concepto de «código de histonas». ¿Por qué se llama «código»? Compara la acetilación de H3K4 con la trimetilación de H3K9 en términos de efecto sobre la expresión génica, enzimas responsables, y relación con heterocromatina o eucromatina.

2. Describe los mecanismos por los que los elementos transponibles pueden causar enfermedades genéticas en humanos. Incluye al menos dos ejemplos específicos con el mecanismo molecular (nombre del gen afectado, tipo de elemento transponible, y consecuencia fenotípica).

3. Compara el mecanismo de transposición de un transposón de ADN (clase II) con el de un retrotransposón (clase I): intermediario, enzima clave, si hay copia o excisión, impacto sobre el tamaño del genoma, y relevancia en el contexto del cáncer.

3.10 Glosario

Brazo p / brazo q Brazos corto (p) y largo (q) del cromosoma a cada lado del centrómero; nomenclatura usada en citogenética para localizar genes y anomalías estructurales según la nomenclatura ISCN.

Cromatina Complejo de ADN, histonas y proteínas no histónicas que constituye el contenido genético del núcleo eucariota; se presenta como eucromatina (activa) o heterocromatina (silenciada).

DNMT (ADN metiltransferasa) Enzima que cataliza la adición de un grupo metilo a citosinas en contexto CpG; DNMT1 mantiene el patrón de metilación durante la replicación; DNMT3a/3b establecen la metilación de novo durante el desarrollo.

Eucromatina Estado descompactado y transcripcionalmente activo de la cromatina; caracterizada por marcas activas de histonas (H3K4me3, H3K9ac) y accesibilidad de los factores de transcripción.

HERV (*Human Endogenous Retrovirus*) Retrovirus endógeno integrado en el genoma humano; forma un subgrupo de LTR-retrotransposones; representa ∼8 % del genoma; algunas copias han sido exaptadas (p.ej.: sincitina en la formación de la placenta).

Histona H1 Histona enlazante que une el ADN linker entre nucleosomas, mediando la condensación de la fibra de 10 nm a la fibra de 30 nm (solenoide).

Inestabilidad de microsatélites (MSI) Alteración en el número de repeticiones de microsatélites por deficiencia del sistema MMR; marcador diagnóstico del síndrome de Lynch; predictor de respuesta a inmunoterapia con inhibidores de punto de control inmunitario.

Nucleosoma Unidad básica de la cromatina; octámero de histonas (H2A, H2B, H3, H4) + 147 pb de ADN enrollado; visualizable como «cuentas en un collar» por microscopía electrónica.

TAD (*Topologically Associating Domain*) Dominio cromosómico tridimensional definido por interacciones de cromatina en cis detectadas por captura de conformación cromosómica (Hi-C); unidad funcional de regulación génica a larga distancia.

Telomerasa Ribonucleoproteína (TERT = componente catalítico; TERC = componente de ARN) que añade repeticiones TTAGGG al extremo 3' del cromosoma; activa en células germinales y cancerosas; inactiva en células somáticas adultas.

Impronta genómica (*genomic imprinting*) Fenómeno por el cual ciertos genes se expresan monoalelicamente según el progenitor de origen, determinado por marcas epigenéticas (metilación del ADN) establecidas en la línea germinal; alteraciones de la impronta causan síndromes como Prader-Willi y Angelman.

ChIP-seq *Chromatin Immunoprecipitation* seguida de secuenciación masiva; mapea la distribución genómica de modificaciones de histonas o factores de transcripción; herramienta estándar para caracterización del epigenoma en investigación y oncología de precisión.

ATAC-seq *Assay for Transposase-Accessible Chromatin*; mapea regiones de cromatina abierta (nucleosoma-libre) en el genoma; puede realizarse con muy poco material de partida incluyendo células únicas; identifica enhancers y promotores activos.

Enhancer hijacking Mecanismo oncogénico en el que una reconfiguración de los límites de los dominios TAD (p.ej., por mutación de sitios CTCF) permite que un enhancer activo interactúe

aberrantemente con un proto-oncogén, activando su expresión en el tipo celular incorrecto.

Pirosecuenciación bisulfito (MS-PCR) Técnica de análisis de metilación del ADN a resolución de nucleótido único, basada en la conversión de citosinas no metiladas a uracilos por el bisulfito sódico; método de referencia para el diagnóstico de síndromes de imprinting en laboratorios de genética molecular.

3.11 Resumen

El genoma humano, con sus 3,2 × 10^9 pares de bases distribuidos en 23 pares de cromosomas, se compacta en el núcleo celular mediante una organización jerárquica de al menos cinco niveles. La unidad básica de esta organización es el nucleosoma —147 pb de ADN enrollados alrededor de un octámero de histonas H2A, H2B, H3 y H4—, que se organiza progresivamente en el solenoide de 30 nm, dominios de bucle (tads) y, finalmente, el cromosoma metafásico con un factor de compactación de ∼10.000 veces. Las variantes de histonas especializadas (CENP-A, H3.3, H2A.X) añaden funcionalidad específica a regiones cromosómicas particulares.

Las colas N-terminales de las histonas son plataformas dinámicas de modificaciones epigenéticas —el «código de histonas»— que activan o silencian genes sin modificar la secuencia del ADN. La metilación del ADN en dinucleótidos CpG constituye un segundo nivel de control epigenético: la metilación de islas CpG en promotores silencia genes, y la hipermetilación aberrante de genes supresores de tumores es un mecanismo epigenético central en oncogénesis, con relevancia

terapéutica directa (inhibidores de dnmt: azacitidina, decitabina). Los complejos de remodelación de cromatina como SWI/SNF, ISWI y CHD coordinan estos procesos mediante el reposicionamiento de nucleosomas dependiente de atp.

Estructuralmente, cada cromosoma posee un centrómero —punto de anclaje del aparato de división— y telómeros —protegidos por la shelterina y mantenidos por la telomerasa—. El patrón de bandas G (nomenclatura iscn) permite la identificación citogenética de cada cromosoma en el cariotipo convencional, mientras que la técnica FISH extiende esta capacidad a la resolución submicroscópica, detectando translocaciones, amplificaciones y deleciones de relevancia clínica.

La impronta genómica añade una dimensión adicional al control epigenético: ciertos genes se expresan monoalelicamente según el progenitor de origen, determinado por marcas de metilación establecidas en la línea germinal. Las alteraciones de la impronta en 15q11-q13 provocan síndromes de Prader-Willi o de Angelman según el alelo afectado, y su diagnóstico requiere técnicas de análisis de metilación (MS-PCR, pirosecuenciación bisulfito) que son responsabilidad técnica del BQF en el laboratorio de genética molecular.

Finalmente, los elementos genéticos móviles —transposones de ADN (mecanismo cortary-pegar) y retrotransposones como LINE-1 y los elementos *Alu* (mecanismo copiary-pegar)— representan colectivamente ~45 % del genoma humano. Su movilización

está normalmente reprimida por metilación del ADN y por la vía PIWI-piARN, pero cuando esta represión falla en el cáncer contribuyen a la inestabilidad genómica. Su variabilidad en microsatélites es la base de aplicaciones forenses, de diagnóstico de paternidad y de monitorización del quimerismo post-trasplante que el BQF realiza en el laboratorio clínico. Las herramientas de análisis epigenómico de alto rendimiento —ChIP-seq, ATAC-seq, secuenciación bisulfito— permiten hoy caracterizar el epigenoma tumoral con resolución de nucleótido único, abriendo el camino a la terapia epigenética basada en inhibidores de dnmt e hdac ya en uso clínico.

CAPÍTULO IV

4 CÓDIGO GENÉTICO Y FLUJO DE INFORMACIÓN GENÉTICA: REPLICACIÓN, TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN

El capítulo anterior mostró cómo el ADN se organiza en la cromatina y los cromosomas. Ahora profundizamos en los tres procesos moleculares que constituyen el dogma central: la replicación (cómo el ADN se copia fielmente antes de cada división celular), la transcripción (cómo el ADN se lee para producir ARN) y la traducción (cómo el ARN mensajero se convierte en proteína). Estos procesos, conservados en todos los seres vivos, son los blancos moleculares de numerosos antibióticos, antivirales y estrategias terapéuticas innovadoras.

4.1 Introducción

El flujo de información genética —del ADN al ARN a la proteína— no ocurre de manera continua ni uniforme en todas las células. Es un proceso exquisitamente regulado, con puntos de control en cada etapa que garantizan que solo los genes apropiados se expresen en el momento y el tejido correcto. Pero antes de que pueda expresarse, el genoma debe copiarse con fidelidad: cualquier error en la replicación que no sea corregido se convierte en una mutación heredable (Watson et al., 2014).

El código genético es el «diccionario» que permite la traducción entre el lenguaje de los nucleótidos (tripletes de bases) y el lenguaje de los

aminoácidos. Su desciframiento en la década de 1960 fue uno de los logros más significativos de la biología molecular del siglo XX, y su comprensión es indispensable para interpretar las consecuencias moleculares de cualquier mutación (Lewin et al., 2022).

La reparación del ADN es la función defensiva que hace posible la estabilidad del genoma a pesar del constante daño endógeno y exógeno. Los defectos en los mecanismos de reparación son la causa de enfermedades como el xeroderma pigmentoso, el síndrome de Lynch y los cánceres hereditarios de mama y ovario —condiciones que el BQF identifica en el laboratorio de biología molecular diagnóstica (Kumar et al., 2018).

4.2 Objetivos de Aprendizaje

1. Explicar las propiedades del código genético (degenerado, universal, no solapante, sin puntuación) y aplicarlas para predecir el efecto de mutaciones puntuales sobre la secuencia proteica.

2. Describir el mecanismo de replicación semiconservativa del ADN en eucariotas, identificando los componentes de la maquinaria replicativa y sus funciones específicas.

3. Comparar los mecanismos de reparación del ADN (BER, NER, MMR, recombinación homóloga) y relacionarlos con enfermedades hereditarias específicas relevantes para el diagnóstico molecular.

4. Explicar los pasos de la transcripción eucariota, incluyendo el ensamblaje del complejo de preiniciación y el procesamiento postranscripcional del ARNm.

5. Describir el proceso de traducción (iniciación, elongación, terminación) relacionando los componentes moleculares con sus funciones y con los blancos terapéuticos de antibióticos.

6. Clasificar los tipos de mutaciones según su efecto sobre la secuencia proteica y predecir sus consecuencias patológicas.

Preguntas de Enfoque

1. ¿Por qué la degeneración del código genético es una ventaja evolutiva? ¿Qué tipos de mutaciones produce «silenciosamente» gracias a la degeneración?

2. ¿Cómo el experimento de Meselson y Stahl demostró que la replicación del ADN es semiconservativa y no conservativa ni dispersiva?

3. Si el sistema de reparación de emparejamientos erróneos (MMR) falla en una célula somática, ¿qué consecuencias tendría a largo plazo sobre la estabilidad del genoma?

4. ¿Por qué el splicing alternativo del ARNm eucariota permite que un solo gen produzca múltiples proteínas diferentes? ¿En qué condiciones patológicas puede el splicing alternativo ser aberrante?

5. ¿En qué se diferencia la iniciación de la traducción en procariotas (mecanismo Shine-Dalgarno) de la iniciación en eucariotas (barrido ribosomal)? ¿Cómo explota esta diferencia el diseño de antibióticos?

4.3 El código genético

El código genético es el conjunto de reglas que relaciona cada secuencia de tres nucleótidos del ARNm (llamada **codón**) con un aminoácido específico o con una señal de parada de la traducción. Fue descifrado entre 1961 y 1967 por los equipos de Nirenberg, Matthaei, Khorana y Holley, trabajo que fue reconocido con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1968 (Nirenberg & Matthaei, 1961).

4.3.1 Propiedades del código genético

1. **Triplete**: la información se lee en grupos de tres nucleótidos (codones). Con 4 bases posibles en tres posiciones, existen $4^3 = 64$ codones posibles para 20 aminoácidos estándar y 3 señales de parada.

2. **Degenerado (redundante)**: la mayoría de los aminoácidos son codificados por más de un codón. La leucina, por ejemplo, tiene 6 codones; la metionina y el triptófano solo uno cada uno. La degeneración se concentra principalmente en la tercera posición del codón («posición tambaleo» o *wobble position*), descrita por Crick (Karp et al., 2019).

3. **No solapante**: cada nucleótido pertenece a un solo codón; los codones no comparten nucleótidos entre sí.

4. **Sin signos de puntuación internos**: el mensaje se lee de forma continua desde el codón de inicio (AUG) hasta el codón de parada (UAA, UAG, UGA), sin separadores entre codones. Esta propiedad explica por qué las mutaciones que alteran el marco de lectura (inserción o deleción de 1 ó 2 nucleótidos) tienen consecuencias

devastadoras: todo el mensaje aguas abajo queda incorrectamente codificado.

5. **Universal**: con pocas excepciones (mitocondrias de algunos organismos, *Mycoplasma*), el mismo código aplica a todos los seres vivos conocidos, lo que evidencia la unidad evolutiva de la vida y permite la tecnología del ADN recombinante (Lewin et al., 2022).

Concepto Clave

El codón **AUG** cumple una doble función: es el único codón de inicio (*start*) que especifica la incorporación de metionina (y, en procariotas, N-formilmetionina). El marco de lectura queda fijado desde este primer AUG. Los codones de parada (UAA, UAG, UGA) no codifican ningún aminoácido: son reconocidos por factores de terminación proteicos (eRF1/eRF3 en eucariotas), no por ARNt (Watson et al., 2014).

4.3.2 Excepciones al código genético universal

Las mitocondrias usan un código genético ligeramente diferente: UGA (codón de parada en el código universal) codifica triptófano en las mitocondrias humanas; AUA codifica metionina en lugar de isoleucina; AGA y AGG codifican aminoácidos distintos a los del código estándar en algunos organismos. Estas diferencias tienen implicaciones directas para las enfermedades mitocondriales, donde mutaciones en codones mitocondriales deben interpretarse con el código apropiado (Strachan & Read, 2019).

4.3.3 Mutaciones y sus consecuencias sobre la proteína

Las mutaciones puntuales en la secuencia codificante producen efectos muy diferentes según Nussbaum et al. (2016):

Mutación sinónima (silenciosa): el cambio de nucleótido no altera el aminoá-

cido codificado, gracias a la degeneración del código. Ej.: GCU →GCC, ambos codifican alanina.

Mutación de sentido erróneo (*missense*): el cambio produce un aminoácido diferente. Ej.: GAG →GTG es el cambio que causa anemia falciforme: Glu → Val en posición 6 de la cadena β de la hemoglobina.

Mutación sin sentido (*nonsense*): el cambio convierte un codón de aminoácido en un codón de parada prematuro. Produce una proteína truncada, generalmente no funcional. El ARNm suele ser degradado por el mecanismo nmd (*NonsenseMediated Decay*).

Mutación de cambio de marco (*frameshift*): inserción o deleción de 1–2 nucleótidos desplaza el marco de lectura, alterando todos los aminoácidos aguas abajo hasta encontrar un codón de parada en el nuevo marco.

Tabla 9. Tipos de mutaciones puntuales y sus consecuencias sobre la secuencia proteica.

Tipo	Cambio	Efecto proteico	Ejemplo clínico
Sinónima (silenciosa)	Base →base (mismo aa)	Ninguno	Variable
Missense conservadora	Base →base (aa similar)	Leve o ninguno	Polimorfismo benigno
Missense no conservadora	Base →base (aa diferente)	Pérdida/ganancia función	Anemia falciforme (HBB E6V)
Nonsense	Base →codón stop	Proteína truncada; NMD	Distrofia muscular Duchenne
Frameshift +1/-1	Inserción/deleción 1 nt	Secuencia alterada + stop prematuro	Fibrosis quística (F508del)

Fuente: Nussbaum et al. (2016) y Strachan & Read (2019).

Nota. aa: aminoácido; NMD: *Nonsense-Mediated Decay*; nt: nucleótido.

4.3.4 Codones, microARN y regulación postranscripcional: más allá del dogma central

El dogma central se ha ampliado con el descubrimiento de los **microARN (miARN)**: ARN de ~22 nt no codificantes que reprimen la traducción o inducen la degradación de ARNm diana mediante complementariedad parcial con la región 3'-UTR (Bartel, 2004). Los mecanismos incluyen:

Represión traduccional: el complejo RISC (con miARN + proteínas Argonauta) se une al ARNm diana e impide la elongación de la traducción.

Deadenilación: el complejo RISC recluta enzimas que eliminan la cola poli-A, desestabilizando el ARNm.

Procesamiento en cuerpos P: el ARNm reprimido puede ser almacenado en cuerpos de procesamiento (P-bodies) citoplasmáticos o degradado.

Los miARN son relevantes clínicamente: miR-21 está sobreexpresado en múltiples tumores y reprime supresores como PTEN; miR-155 modula la respuesta inmune y está amplificado en linfomas de células B. Las terapias basadas en miARN (antagomirs, mimics) están en ensayos clínicos activos, como documenta Bartel (2004).

4.4 Replicación del ADN

La replicación del ADN es el proceso por el que el genoma se duplica con extraordinaria fidelidad antes de cada división celular. El modelo **semiconservativo** —propuesto por Watson y Crick en 1953 y demostrado experimentalmente por Meselson y Stahl en 1958 (Meselson & Stahl, 1958)— establece que cada cadena de la doble hélice sirve de molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria.

4.4.1 La maquinaria replicativa eucariota

La replicación en eucariotas se inicia simultáneamente en múltiples **orígenes de replicación** (miles en un genoma humano), lo que permite completar la duplicación del enorme genoma eucariota en unas pocas horas. Los principales componentes de la maquinaria replicativa son:

Complejo MCM (*Mini-Chromosome Maintenance*): helicase que separa las dos cadenas de la doble hélice en la horquilla de replicación, rompiendo los puentes de hidrógeno.

Proteínas RPA (*Replication Protein A*): equivalente eucariota de las proteínas SSB; estabilizan las cadenas separadas impidiendo su re-apareamiento y reclutan factores de reparación.

Topoisomerasa I y II: eliminan la tensión torsional generada adelante de la horquilla; la topoisomerasa II es el blanco de los antibióticos fluoroquinolonas (en bacterias) y de los quimioterápicos topo-II-venenos (doxorrubicina, etopósido) en el tratamiento del cáncer (Alberts et al., 2022).

Primasa: sintetiza un cebador corto de ARN (∼10 nt), imprescindible porque las ADN polimerasas no pueden iniciar la síntesis de novo.

ADN polimerasa δ **y** ε: añaden nucleótidos desoxiribosídicos en dirección 5'→3', leyendo la cadena molde en dirección 3'→5'. Poseen actividad correctora de lectura (*proofreading*) 3'→5' que elimina los nucleótidos incorrectamente incorporados. Pol ε actúa en la cadena líder y pol δ en la cadena rezagada (Lodish et al., 2021).

PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*): pinza deslizante que mantiene la ADN polimerasa procesiva sobre el molde; también coordina la respuesta al daño al ADN y la reparación.

ADN ligasa I: sella los cortes de fosfodiéster que quedan entre los fragmentos de Okazaki.

4.4.2 Cadena líder y cadena rezagada

Debido a que la ADN polimerasa solo sintetiza en dirección 5'→3', las dos cadenas de la horquilla de replicación se sintetizan de forma diferente:

Cadena líder: sintetizada de forma continua en la dirección de avance de la horquilla.

Cadena rezagada: sintetizada de forma discontinua en pequeños fragmentos (**fragmentos de Okazaki**, de 100–200 nt en eucariotas), en dirección opuesta al avance de la horquilla. Cada fragmento requiere su propio cebador de ARN, que es posteriormente eliminado por RNAsa H1/FEN1 y el hueco rellenado por ADN pol δ (Watson et al., 2014).

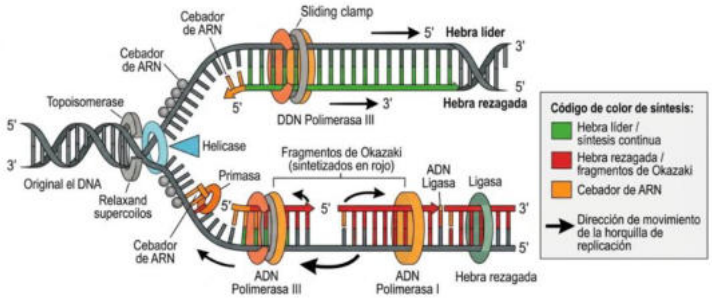


Figura 10. Horquilla de replicación del ADN eucariota.

La cadena líder (teal) se sintetiza de forma continua en la dirección de la horquilla; la cadena rezagada (rojo) se sintetiza en fragmentos de Okazaki de manera discontinua. Cada fragmento de Okazaki requiere un cebador de ARN (naranja discontinuo). La proteína PCNA actúa como pinza deslizante manteniendo la procesividad de las ADN polimerasas. Elaboración propia basada en Watson et al. (2014) y Alberts et al. (2022).

4.4.3 Fidelidad de la replicación: mecanismos de corrección

La tasa de error de la replicación del ADN en eucariotas es extraordinariamente baja: ∼1 error por cada 10^9–10^{10} pares de bases copiadas. Esta fidelidad se logra mediante tres mecanismos sucesivos (Alberts et al., 2022):

1. **Selección del nucleótido**: las ADN polimerasas prefieren con alta especificidad el nucleótido correctamente apareado por la geometría del sitio activo. La tasa de error inicial es ∼$1/10^5$.

2. **Actividad de proofreading 3'→5'**: si se incorpora un nucleótido incorrecto, la pol δ/ε lo detecta (el emparejamiento erróneo distorsiona el extremo 3') y lo elimina con su exonucleasa 3'→5' antes de continuar la síntesis. Reduce el error a $\sim 1/10^7$.

3. **MMR post-replicativo**: los emparejamientos erróneos que escapan al proofreading son corregidos por el sistema MMR. Reduce el error final a $\sim 1/10^9$–10^{10} (Modrich, 2006).

4.4.4 El problema de la replicación terminal y la telomerasa

Los extremos lineales de los cromosomas eucariotas presentan un problema: cada ronda de replicación deja el extremo 5' sin replicar (porque el cebador del último fragmento de Okazaki, al eliminarse, deja un hueco irreparable). Sin la telomerasa, los cromosomas acortarían ~50–100 pb por generación.

La **telomerasa** resuelve esto añadiendo repeticiones TTAGGG al extremo 3' del cromosoma, proporcionando molde para completar la síntesis del extremo 5' (Lodish et al., 2021).

4.5 Reparación del ADN

El ADN es una molécula susceptible al daño. Una célula humana sufre estimadamente ~10,000 lesiones en su ADN por día, causadas por errores de replicación, agentes exógenos (UV, radiación ionizante, carcinógenos químicos) y procesos endógenos (depurinación, desaminación, estrés oxidativo). Sin mecanismos eficientes de reparación, la tasa de mutaciones sería incompatible con la vida (Lindahl, 1993).

4.5.1 Reparación por escisión de bases (BER)

La **reparación por escisión de bases** (BER) corrige lesiones de bases individuales, en particular aquellas causadas por estrés oxidativo (8-oxoguanina), desaminación (uracilo por desaminación de citosina) o metilación espontánea:

1. Una **ADN glicosilasa** específica reconoce y elimina la base dañada, dejando un sitio apurínico/apirimidínico (sitio AP).

2. Una **AP endonucleasa** (APE1 en humanos) corta la cadena en el sitio AP.

3. La ADN polimerasa β rellena el hueco de un nucleótido.

4. La ADN ligasa III/XRCC1 sella el corte (Watson et al., 2014).

Las mutaciones en la glicosilasa MYH (gen *MUTYH*) que repara 8-oxoguanina: adenina causan el síndrome de poliposis colorrectal asociada a MUTYH (map), con alto riesgo de cáncer colorrectal (Kumar et al., 2018).

4.5.2 Reparación por escisión de nucleótidos (NER)

La **reparación por escisión de nucleótidos** (NER) repara lesiones que distorsionan la doble hélice, como los **dímeros de ciclobutano timina** generados por la radiación uv y los aductos formados por carcinógenos como el benzopireno del tabaco:

1. Las proteínas del complejo de reconocimiento XPC/RAD23B detectan la distorsión.

2. El factor TFIIH (también componente del complejo de preiniciación transcripcional) desenrolla el ADN usando sus helicasas XPB y XPD.

3. Las endonucleasas XPF/ERCC1 (corte 5') y XPG (corte 3') escinden un segmento de 25–30 nucleótidos.

4. La ADN polimerasa δ/ε rellena el hueco y la ligasa sella (Alberts et al., 2022).

¡Importante!

El defecto en NER causa el **xeroderma pigmentoso** (XP), una enfermedad autosómica recesiva con fotosensibilidad extrema y riesgo de cáncer cutáneo >1.000 veces superior a la población general. Existen 8 grupos de complementación (XPA–XPG + variante XPV por defecto en ADN pol η, que normalmente realiza síntesis de tolerancia al daño a través de dímeros de timina). El diagnóstico se confirma con ensayos de síntesis de reparación no programada (urs) en fibroblastos cultivados

(Strachan & Read, 2019).

4.5.3 Reparación de emparejamientos erróneos (MMR)

El sistema MMR corrige los errores de emparejamiento que escapan a la actividad correctora de la ADN polimerasa durante la replicación (Modrich, 2006):

1. Las proteínas MutSα (**MSH2-MSH6**) o MutSβ (**MSH2-MSH3**) reconocen el emparejamiento erróneo o los bucles de inserción/deleción.

2. Las proteínas MutLα (**MLH1-PMS2**) se reclutan y activan una endonucleasa latente.

3. La cadena hija es incisada, el segmento que incluye el error es excindido por exonucleasas, y la ADN polimerasa δ rellena el hueco (Lewin et al., 2022).

4.5.4 BRCA1/BRCA2 y la recombinación homóloga en el cáncer familiar

Las proteínas **BRCA1** y **BRCA2** son supresores tumorales que coordinan la reparación por recombinación homóloga (hr). Sus funciones específicas son distintas (Ciccia & Elledge, 2010):

BRCA1: actúa en el reconocimiento temprano de las DSB, coordina la resección del extremo 5' para generar ADN de cadena simple, y regula la elección entre hr y nhej. Tiene dominios RING (E3 ubiquitina ligasa), BRCT (interacción con proteínas fosforiladas) y coiled-coil. **BRCA2**: actúa más abajo: carga la recombinasa RAD51 sobre el ADN de cadena simple generado por la resección, permitiendo la búsqueda de homología y la invasión de cadena con la cromátida hermana. Contiene dominios BRC repetidos (unión directa a RAD51).

El concepto de **haploinsuficiencia funcional** y el modelo de Knudson de «dos golpes» se aplican directamente: la mutación germinal en un alelo *BRCA1* o *BRCA2* no es suficiente para causar cáncer (el alelo silvestres provee función suficiente), pero la pérdida del segundo alelo (LOH, *loss of heterozygosity*) en células somáticas elimina la

capacidad de hr, acumulándose mutaciones que conducen a la transformación maligna (Knudson Jr., 1971).

La deficiencia de hr en tumores BRCA crea una vulnerabilidad explotable terapéuticamente: el concepto de **letalidad sintética**. Las células tumorales BRCA-deficientes dependen del sistema ber (concretamente de la enzima PARP-1) para reparar las roturas de cadena simple. La inhibición de PARP con fármacos como **olaparib**, **niraparib** o **rucaparib** colapsa las horquillas de replicación en roturas de doble cadena que la célula BRCA-deficiente no puede reparar, resultando en muerte selectiva del tumor (Kumar et al., 2018).

4.5.5 Reparación de roturas de doble cadena (DSBR)

Las roturas de doble cadena (DSB) son las lesiones más peligrosas del ADN. Existen dos mecanismos principales de reparación (Ciccia & Elledge, 2010):

Recombinación Homóloga (HR): utiliza una cromátida hermana intacta como molde para reparar con alta fidelidad. Requiere las proteínas RAD51 (recombinasa), BRCA1 y BRCA2 (que cargan RAD51 al ADN de cadena simple). HR solo es posible en las fases S y G2 del ciclo celular, cuando la cromátida hermana está disponible. **Unión de Extremos No Homólogos (NHEJ)**: liga directamente los extremos rotos sin molde, con frecuencia introduciendo pequeñas inserciones o deleciones. Es el mecanismo principal en células en G1 y es esencial para la maduración de linfocitos (recombinación V(D)J).

Tabla 10. Mecanismos de reparación del ADN y enfermedades asociadas a su deficiencia.

Sistema	Lesión reparada	Proteínas clave	Gen mutado	Enfermedad
BER	Bases oxidadas/desaminadas	ADN glicosilasas; APE1; pol β	MUTYH	Poliposis colorrectal MAP
NER	Dímeros de timina; aductos UV	XPC; XPB/D; XPF/G	XPA–XPG	Xeroderma pigmentoso
MMR	Emparejamientos erróneos	MSH2/6; MLH1; PMS2	MLH1, MSH2	Síndrome de Lynch
HR	DSB (S/G2)	RAD51; BRCA1/2	BRCA1, BRCA2	Cáncer mama/ovario
NHEJ	DSB (G1)	Ku70/80; DNA-PKcs; XRCC4	Ku70/80	Inmunodeficiencia

Fuente: Alberts et al. (2022), Lindahl (1993), Ciccia & Elledge (2010) y Kumar et al. (2018).

Nota. DSB: doble rotura de cadena; HR: recombinación homóloga; NHEJ: unión de extremos no homólogos; MAP: poliposis asociada a MUTYH.

Aplicación para el Bioquímico Farmacéutico

El síndrome de Lynch es causado por mutaciones germinales en los genes del sistema MMR (principalmente *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*). En el laboratorio, el BQF puede identificar esta condición mediante:

1. **Análisis de MSI por PCR con fluorescencia**: el panel de marcadores de Bethesda (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123, D17S250) compara el tamaño de microsatélites en ADN tumoral vs. tejido normal. MSI-H (≥2 marcadores alterados) indica deficiencia MMR.

2. **Inmunohistoquímica**: detecta pérdida de expresión de proteínas MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) en tejido tumoral fijado.

3. **Secuenciación de genes MMR**: confirma la mutación germinal y clasifica la variante (patogénica, VUS, benigna) según criterios ACMG/AMP.

La identificación del síndrome de Lynch habilita vigilancia colonoscópica intensiva y diagnóstico genético en familiares. Adicionalmente, los tumores MSI-H son respondedores a inmunoterapia con inhibidores de PD-1 (pembrolizumab), lo que hace este análisis relevante para la selección de terapia (Strachan & Read, 2019).

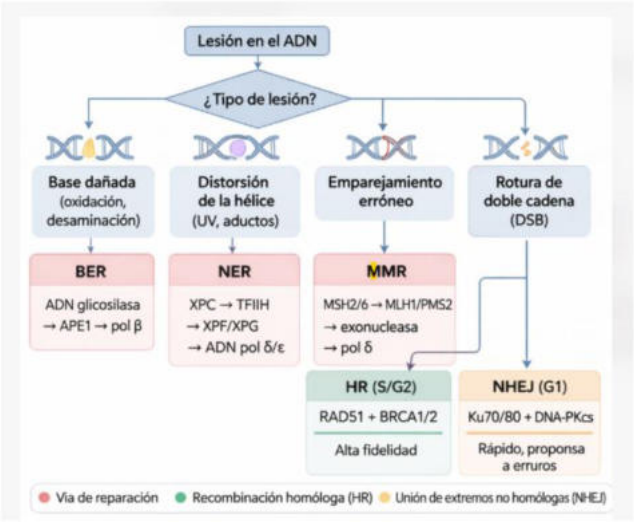


Figura 11. Selección del mecanismo de reparación del ADN según el tipo de lesión.

Selección del mecanismo de reparación del ADN según el tipo de lesión. Los diferentes sistemas de reparación actúan sobre tipos distintos de daño; la elección entre HR y NHEJ para las roturas de doble cadena depende en gran medida de la fase del ciclo celular. BER: reparación por escisión de bases; NER: reparación por escisión de nucleótidos; MMR: reparación de emparejamientos erróneos; HR: recombinación homóloga; NHEJ: unión de extremos no homólogos. Elaboración propia basada en Ciccia y Elledge (2010) y Alberts et al. (2022).

4.6 Transcripción eucariota

La transcripción es el proceso mediante el cual la **ARN polimerasa** utiliza una cadena de ADN como molde para sintetizar una molécula de ARN con secuencia complementaria (Alberts et al., 2022).

4.6.1 Las ARN polimerasas nucleares eucariotas

En eucariotas existen tres ARN polimerasas nucleares:

ARN pol I: sintetiza los ARNr precursores (28S, 18S, 5.8S) en el nucleolo; responsable del ~60 % de la transcripción total en células activas.

ARN pol II: sintetiza los ARNm y la mayoría de los ARN no codificantes (miARN, lncARN); es el blanco de los factores de transcripción generales y del complejo Mediador; su CTD (*C-Terminal Domain*) tiene 52 repeticiones del heptapéptido YSPTSPS que son fosforiladas secuencialmente durante la transcripción.

ARN pol III: sintetiza los ARNt, el ARNr 5S y otros ARN pequeños (snARN, ARN 7SL).

4.6.2 Iniciación de la transcripción y factores de transcripción

La iniciación de la transcripción por la ARN pol II requiere el ensamblaje del **complejo de preiniciación** en el promotor mediante el reclutamiento secuencial de los factores generales de transcripción (gtf): TFIID (reconoce la **TATA box** a ~30 pb del sitio de inicio), TFIIA, TFIIB, TFIIF (que recluta la ARN pol II), TFIIE y TFIIH. El complejo TFIIH tiene actividad helicasa (XPB, XPD) que abre la doble hélice en el promotor (Lewin et al., 2022).

Los **factores de transcripción específicos de tejido** modulan la eficiencia del complejo de preiniciación desde elementos reguladores distales (*enhancers*, que pueden estar a cientos de kb del promotor)

mediante la formación de bucles de cromatina que traen el enhancer al promotor. La proteína ctcf actúa como insulador que delimita los dominios de acción de los enhancers (Alberts et al., 2022).

4.6.3 Procesamiento del ARNm eucariota

El transcrito primario (pre-ARNm) sufre modificaciones cotranscripcionales y postranscripcionales antes de exportarse al citoplasma:

1. **Capping 5'**: adición cotranscripcional de la caperuza de 7-metilguanosina tras la síntesis de los primeros ~25 nt; protege el ARNm de la degradación 5'→3' y facilita el reconocimiento por la maquinaria de traducción (factor eIF4E).

2. **Poliadenilación 3'**: el complejo CPSF/CstF reconoce la señal AAUAAA ~20 nt antes del sitio de corte; la ARN pol II se detiene, el ARNm es liberado y la poli-A polimerasa añade ~200 residuos adenina; la cola poli-A protege de degradación 3'→5' y promueve la exportación nuclear (Watson et al., 2014).

3. **Splicing**: los intrones son eliminados y los exones son unidos por el **espliceosoma** (complejo de 5 snRNP: U1, U2, U4, U5, U6). El espliceosoma cataliza la transesterificación en dos pasos mediante el sitio de ramificación intrónico.

4. **Splicing alternativo**: permite que diferentes combinaciones de exones sean incluidas en el ARNm maduro, generando múltiples isoformas desde un solo gen. Se estima que >95 % de los genes humanos con múltiples exones sufren splicing alternativo. Las

mutaciones en sitios de splicing (donador 5', aceptor 3', punto de ramificación) producen exones omitidos (*exon skipping*) o retención de intrones, frecuentemente patogénicas (Strachan & Read, 2019).

4.6.4 Regulación de la transcripción por factores específicos de tejido

Los factores de transcripción específicos de tejido permiten que el mismo genoma produzca diferentes tipos celulares. Son proteínas modulares con:

Dominio de unión al ADN: reconoce secuencias reguladoras específicas en el ADN (cajas, módulos cis-regulatorios). Tipos comunes: dedo de zinc (ZF), hélice-vuelta-hélice (HTH), leucina zipper (bZIP), dominio bHLH. **Dominio de activación o represión transcripcional**: contacta el complejo Mediador y los gtf para modular la ARN pol II.

Ejemplo clínico: el factor de transcripción **PAX8** es esencial para el desarrollo tiroideo. Las mutaciones en *PAX8* causan hipotiroidismo congénito por agenesia/hipoplasia tiroidea. En el cáncer de tiroides papilar, la fusión génica *PAX8-PPARG* (cromosoma 3/2) es un oncogén determinante. La regulación postranscripcional a través de miARN también modula la expresión génica de forma tisular y temporal: el miR-122 es específico del hígado y regula genes del metabolismo lipídico (Bartel, 2004).

¿Sabías que. . . ?

El gen de la distrofina (*DMD*) es el gen humano codificante de proteínas más largo conocido: ocupa ∼2.4 Mb del cromosoma X (cubre el 0,075 % del genoma humano) y contiene 79 exones. La transcripción de un solo pre-ARNm de distrofina tarda ∼16 horas. Este hecho explica por qué las neuronas postmitóticas, que son longevas y tienen alta actividad de transcripción, son las células que más acumulan daño oxidativo en el ADN a lo largo de la vida (Strachan & Read, 2019).

4.7 Traducción

La traducción es la síntesis de una cadena polipeptídica a partir de la información codificada en el ARNm. Ocurre en los **ribosomas** y requiere los ARNt cargados con sus aminoácidos correspondientes por las aminoacil-ARNt sintetasas (Lodish et al., 2021).

4.7.1 Los ARNt y las aminoacil-ARNt sintetasas

Los ARNt son moléculas de ∼75–95 nt con estructura tridimensional en «L» (o vista en 2D: trébol). Cada ARNt tiene:

Un **anticodón** en el bucle anticodón que reconoce específicamente el codón del ARNm por complementariedad antiparalela. El extremo **3'-CCA** donde se carga el aminoácido mediante un enlace éster de alta energía.

Las **aminoacil-ARNt sintetasas** (aaRS) catalizan la aminoacilación del ARNt en dos pasos:

1. Activación del aminoácido con ATP: aa + ATP →aa-AMP + PPi. 2. Transferencia al ARNt: aa-AMP + ARNt →aa-ARNt + AMP.

Existen 20 aaRS, una por aminoácido. Son las enzimas que «leen» el código genético: el ARNt es el adaptador, pero la aaRS asegura que el adaptador correcto lleve el aminoácido correcto. Mutaciones en genes de aaRS causan neuropatías hereditarias periféricas (gen *GARS*, *YARS*) (Lewin et al., 2022).

4.7.2 El ribosoma eucariota y las fases de la traducción

El ribosoma eucariota (80S) se compone de la subunidad mayor (60S: ARNr 28S, 5.8S, 5S + ∼50 proteínas) y la subunidad menor (40S: ARNr 18S + ∼33 proteínas). La **actividad peptidiltransferasa** es catalizada por el ARNr 28S —uno de los ejemplos más importantes de una ribozima con relevancia fisiológica (Karp et al., 2019).

1. **Iniciación**: La subunidad 40S, cargada con el ARNt iniciador (Met-ARNt^(Met) *i*) y los factores eIF, escanea el ARNm desde el extremo 5’ hasta encontrar el primer AUG en contexto Kozak óptimo (5’-(gcc)*n*GCC**AUG**G-3’). La subunidad 60S se une para formar el ribosoma 80S competente.

2. **Elongación**: El ciclo se repite para cada aminoácido: (a) el ARNt aminoacilado entra al **sitio A** con la ayuda del factor eEF1A-GTP; (b) el ARNr 28S cataliza la **transferencia del peptidilo** al nuevo aminoácido; (c) la **translocación** mediada por eEF2-GTP avanza el ARNm tres nucleótidos.

3. **Terminación**: Cuando el ribosoma alcanza un codón de parada, los **factores de liberación** (eRF1, eRF3) hidrolizan el enlace entre el ARNt y la cadena polipeptídica, liberando la proteína.

4.7.3 Antibióticos inhibidores de la traducción

La diferencia entre el ribosoma procariota (70S) y eucariota (80S) es la base del diseño de antibióticos:

Aminoglucósidos (gentamicina, amikacina): se unen al ARNr 16S de la subunidad 30S bacteriana, causando errores de lectura (mal emparejamiento codónanticodón). **Tetraciclinas**: bloquean la entrada del ARNt aminoacilado al sitio A del ribosoma 30S bacteriano. **Macrólidos** (eritromicina, azitromicina): bloquean el túnel de salida del péptido naciente en el ribosoma 50S. **Cloranfenicol**: inhibe la actividad peptidiltransferasa del ARNr 23S; su toxicidad sobre mitocondrias (que tienen ribosomas 70S) explica la anemia aplásica idiosincrática como efecto adverso (Karp et al., 2019).

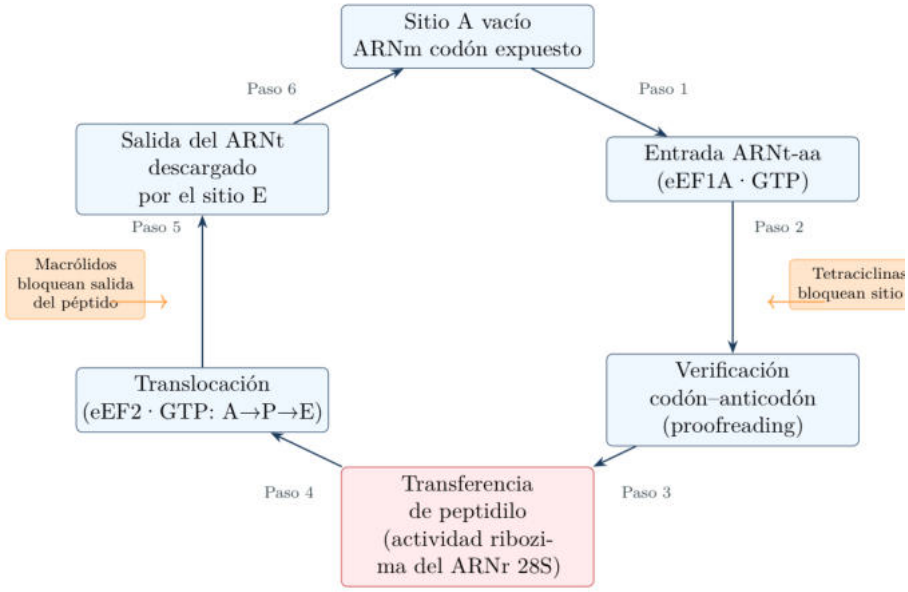


Figura 12. Ciclo de elongación de la traducción eucariota.

Los seis pasos del ciclo muestran la entrada del ARNt aminoacilado al sitio A, la transferencia del peptidilo catalizada por el ARNr 28S (ribozima), y la translocación del ARNm mediada por eEF2. Las dianas de los antibióticos tetraciclinas (sitio A) y macrólidos (túnel de salida del péptido) se indican en naranja. Elaboración propia basada en Karp et al. (2019) y Lodish et al. (2021).

4.7.4 Regulación de la traducción y respuesta al estrés celular

La traducción no ocurre a tasa constante: la célula regula activamente cuándo y cuánto traduce, especialmente en respuesta al estrés (Lodish et al., 2021):

Regulación por eIF4E: el factor de iniciación eIF4E (que reconoce la caperuza 5') es el componente limitante de la traducción en la mayoría

de las células. La vía PI3K→AKT→mTORC1 fosforila las proteínas 4E-BP, liberando eIF4E y activando la traducción de ARNm que codifican proteínas de crecimiento y proliferación (ciclinas, *c-MYC*, *VEGF*). Los inhibidores de mTOR (everolimus, temsirolimus) bloquean este eje terapéuticamente.

Respuesta al estrés — gránulos de estrés: cuando la célula enfrenta hipoxia, choque térmico o privación de nutrientes, la kinasa HRI u otras eak fosforilan eIF2α, deteniendo globalmente la traducción cap-dependiente. El ARNm se secuestra en **gránulos de estrés** (SG), complejos ribonucleoproteicos citoplásmicos que protegen los ARNm del procesamiento.

Traducción cap-independiente (IRES): algunos ARNm virales y celulares contienen elementos IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) que reclutan el ribosoma directamente, sin caperuza 5'. Esto permite traducción durante el estrés o la infección viral. El virus polio usa un IRES para traducir su ARN viral incluso cuando la célula huésped ha detenido la síntesis de proteínas (Karp et al., 2019).

Concepto Clave

Las mitocondrias poseen ribosomas del tipo procariota (55S, con subunidades 28S y 39S), lo que explica la toxicidad mitocondrial de algunos antibióticos que inhiben ribosomas bacterianos, como el cloranfenicol. Esta dualidad ribosomal también explica los efectos secundarios de los aminoglucósidos sobre la cóclea (ototoxicidad) y el riñón (nefrotoxicidad), donde la alta concentración mitocondrial y la

demanda energética hacen a las células más sensibles al daño ribosomal mitocondrial (Strachan & Read, 2019).

Caso Clínico

Situación: En el laboratorio de diagnóstico molecular de un hospital oncológico, el BQF recibe muestras de tejido colorrectal de tres pacientes. En uno de ellos, el análisis de MSI por PCR con marcadores fluorescentes (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123, D17S250) muestra inestabilidad alta (msi-H): los picos electroforéticos del tejido tumoral presentan tamaños claramente diferentes a los del tejido normal adyacente. El análisis de inmunohistoquímica muestra pérdida de expresión de MLH1 y PMS2.

Preguntas para el análisis:

1. ¿Por qué un tumor con deficiencia del sistema MMR acumula cambios en la longitud de los microsatélites?

2. ¿Qué consecuencias tiene la pérdida de MLH1 sobre el sistema MMR? ¿Qué papel juega MLH1 normalmente en la reparación?

3. ¿Qué pasos diagnósticos adicionales deberían seguirse para determinar si este paciente tiene síndrome de Lynch germinal o silenciamiento epigenético somático de *MLH1* (hipermetilación de su promotor)?

En el Laboratorio

Análisis de inestabilidad de microsatélites (MSI) por PCR con fluorescencia Fundamento: Los microsatélites (str) son secuencias

repetidas en tándem (ej.: CACACACA. . .) distribuidas por todo el genoma. En células con deficiencia de MMR, los errores de emparejamiento en las repeticiones durante la replicación no son corregidos, acumulando cambios en el número de repeticiones que alteran el tamaño del fragmento PCR.

Protocolo:

1. **Extracción de ADN**: por separado de tejido tumoral y tejido normal (mucosa adyacente) del mismo paciente, mediante columna de sílice desde tejido fresco, congelado o ffpe.

2. **PCR multiplex fluorescente**: amplificación simultánea de los 5 marcadores de Bethesda (BAT25, BAT26, D5S346, D2S123, D17S250) con uno de los cebadores marcado con fluorocromo (FAM, HEX o NED).

3. **Análisis de fragmentos por electroforesis capilar**: en secuenciador automático (ABI3130, ABI3500); el software GeneScan®/GeneMapper® detecta los picos de fluorescencia.

4. **Interpretación**: comparar tamaños de alelos en tumor vs. normal. MSI-H: ≥2 marcadores alterados; MSI-L: 1 marcador; MSS: ningún marcador alterado.

Criterio de calidad BQF: Controles positivos (línea celular con MSI-H documentado) y controles negativos (ADN normal) deben incluirse en cada corrida. El ratio tumor/normal de ADN de alta calidad (A260/A280 ≥1.7; fragmento >200 bp en gel de calidad) es esencial para el análisis en muestras FFPE.

Con el dominio del código genético y los tres procesos del dogma central —replicación, transcripción, traducción—, el capítulo 5 se adentrará en los principios de herencia genética: cómo la información almacenada en el genoma se transmite fielmente de generación en generación siguiendo las leyes de Mendel, y cómo esa transmisión puede desviarse en patrones no mendelianos.

Conceptos Clave

Aminoacil-ARNt sintetasa Enzima que carga específicamente un aminoácido sobre su ARNt cognado mediante un enlace éster de alta energía; garantiza la fidelidad del código genético al nivel del adaptador.

BER (Base Excision Repair) Sistema de reparación que elimina bases dañadas individuales mediante ADN glicosilasas específicas; repara lesiones oxidativas (8-oxoG), desaminaciones (uracilo) y metilaciones aberrantes.

Codón Triplete de tres nucleótidos del ARNm que especifica un aminoácido o una señal de parada; existen 64 codones posibles para 20 aminoácidos y 3 codones stop.

Degeneración del código genético Propiedad por la que la mayoría de los aminoácidos son especificados por más de un codón; la variación se concentra en la tercera posición (*wobble*).

DSB (Doble rotura de cadena) Lesión del ADN en la que ambas cadenas son cortadas simultáneamente; reparada por HR (alta fidelidad, S/G2) o NHEJ (rápido, propenso a errores, G1).

Espliceosoma Complejo molecular de 5 snRNPs (U1, U2, U4, U5, U6) que cataliza el splicing del pre-ARNm; su alteración produce mutaciones de sitio de splicing con omisión de exones.

Fragmento de Okazaki Fragmento de ADN de 100–200 nt sintetizado discontinuamente en la cadena rezagada durante la replicación eucariota.

Missense Mutación puntual que cambia un codón de un aminoácido a otro diferente; puede ser conservadora (aa similar) o no conservadora (aa diferente) según las propiedades fisicoquímicas.

MMR (Mismatch Repair) Sistema que corrige emparejamientos erróneos postreplicativos; su defecto causa síndrome de Lynch, detectado por análisis de MSI.

Nonsense Mutación que convierte un codón de aminoácido en un codón de parada prematuro; produce proteína truncada; el ARNm suele ser degradado por NMD.

NER (Nucleotide Excision Repair) Sistema que escinde segmentos de 25–30 nt alrededor de lesiones que distorsionan la hélice; su defecto causa xeroderma pigmentoso.

PCNA Pinza deslizante que mantiene la procesividad de las ADN polimerasas durante la replicación; también coordina la reparación del ADN y la respuesta al daño.

Replicación semiconservativa Mecanismo demostrado por Meselson y Stahl (1958) en el que cada cadena parental sirve de molde; cada molécula hija contiene una cadena parental y una nueva.

Sitios A, P, E del ribosoma Sitios funcionales del ribosoma: A (aminoacilo, entrada del ARNt cargado), P (peptidilo, ARNt con cadena peptídica), E (salida del ARNt descargado).

Splicing alternativo Proceso en el que diferentes combinaciones de exones son unidas en el ARNm maduro; permite generar múltiples isoformas proteicas desde un gen; >95 % de genes humanos multiexónicos sufren splicing alternativo.

Actividades de Consolidación

Actividad 1. labelindent **Uso de la tabla del código genético.**, Dada la secuencia de ADN molde: 3'-TAC–CGT–GTT–ACC–ATG–5',

(a) escribe la secuencia del ARNm correspondiente;

(b) traduce los primeros 5 codones;

(c) predice qué ocurriría si la segunda base del segundo codón muta de G a A (cambio CGT→CAT en el ADN).

Actividad 2. labelindent **Análisis de MSI.** Simulen en el laboratorio el análisis de MSI utilizando los electroferogramas de ejemplo proporcionados por el docente para los marcadores BAT25 y BAT26. Determinen si cada muestra es MSI-H, MSI-L o MSS según los criterios de Bethesda. Discutan el impacto diagnóstico para el paciente (diagnóstico de Lynch vs. MSI epigenético).

Actividad 3. labelindent **Análisis de mutaciones causales.** Para cada una de las siguientes mutaciones en el gen *HBB* (hemoglobina beta), predice el efecto sobre la proteína:

(a) c.20A>T (Glu→Val);

(b) c.79G>A (Glu→Lys);

(c) c.92+1G>T (mutación de sitio de splicing donador);

(d) c.315+1G>A.

Clasifica cada una según el tipo de mutación. ¿Cuáles causarían anemia falciforme y cuáles β-talasemia?

Actividad 4. labelindent **Antibióticos y ribosomas.** Investiguen el mecanismo molecular de acción de la eritromicina y la gentamicina. ¿Por qué la gentamicina tiene ototoxicidad? ¿En qué se diferencia su mecanismo

del de la tetraciclina? Elaboren una tabla comparativa de mecanismo, sitio de unión ribosomal, subunidad diana y espectro de actividad.

4.8 Preguntas de Autoevaluación

A. Opción múltiple

1. ¿Cuántos codones del código genético codifican aminoácidos (sin contar los codones de parada)?

(a) 64

(b) **61**

(c) 20

(d) 32

2. El experimento de Meselson y Stahl (1958) demostró la replicación semiconservativa usando:

(a) Radiomarcaje con ^{32}P

(b) Microscopía electrónica de horquillas de replicación

(c) **Isótopos de nitrógeno (^{14}N y ^{15}N) con centrifugación en gradiente de CsCl**

(d) Enzimas de restricción para mapear los orígenes de replicación

3. El sistema de reparación deficiente en el síndrome de Lynch es:

(a) NER

(b) BER

(c) **MMR**

(d) NHEJ

4. El splicing alternativo del ARNm:

(a) Elimina el intrón más largo del pre-ARNm

(b) Requiere la ARN polimerasa II directamente

(c) **Permite generar múltiples isoformas proteicas desde un solo gen**

(d) Solo ocurre en células de mamíferos adultos

5. La poliadenilación del ARNm eucariota ocurre:

(a) En el extremo 5’ del ARNm

(b) Antes de la adición de la caperuza de 7-metilguanosina

(c) **En el extremo 3’ del ARNm, tras la señal AAUAAA**

(d) En el citoplasma, después de la exportación nuclear

6. Los aminoglucósidos como la gentamicina inhiben la traducción bacteriana porque:

(a) Bloquean el sitio de unión de la ARN pol II

(b) Inhiben la actividad peptidiltransferasa del ARNr 23S

(c) **Se unen al ARNr 16S causando errores de lectura del codón**

(d) Impiden la formación de la caperuza 5’ del ARNm bacteriano

7. Una mutación que convierte el codón GAA (Glu) en TGA (Stop) se clasifica

como:

(a) Mutación missense

(b) Mutación sinónima

(c) Mutación de cambio de marco

(d) **Mutación nonsense**

8. La recombinación homóloga (HR) es el mecanismo preferido para reparar roturas de doble cadena en la fase S/G2 porque:

(a) Es más rápida que NHEJ en esas fases del ciclo

(b) No requiere proteínas especializadas

(c) **La cromátida hermana idéntica está disponible como molde de alta fidelidad**

(d) NHEJ está inactivo en S/G2

B. Verdadero o Falso — justifique su respuesta

1. «La degeneración del código genético significa que dos codones diferentes pueden especificar el mismo aminoácido.» *Verdadero.* Esta es precisamente la definición de degeneración: la mayoría de los aminoácidos son codificados por más de un codón (ej.: Leu tiene 6 codones: UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG).

2. «Una mutación de cambio de marco que inserta un nucleótido en el primer exón siempre produce una proteína no funcional.» *Verdadero (generalmente).* La inserción de 1 nucleótido desplaza el marco de lectura en todos los codones siguientes, produciendo una secuencia de aminoácidos aberrante desde el punto de inserción hasta el primer codón de parada en el nuevo marco. Sin embargo, existe la posibilidad de que una segunda mutación compensatoria restaure el marco.

3. «Los antibióticos macrólidos como la eritromicina inhiben tanto los ribosomas bacterianos como los mitocondriales humanos con igual eficiencia.» *Falso.* Los macrólidos se unen específicamente al rARN 23S de la subunidad 50S bacteriana. Aunque las mitocondrias tienen ribosomas 55S (con un componente 39S análogo), la afinidad de los macrólidos por el ribosoma mitocondrial humano es mucho menor que por el bacteriano, lo que confiere selectividad clínica aceptable.

C. Análisis de Casos

1. Un joven de 15 años es referido por lesiones cutáneas premalignas múltiples (queratosis actínicas), carcinomas de células escamosas incipientes y fotofobia intensa, a pesar de vivir en un clima templado con exposición solar moderada. La historia familiar revela que un hermano mayor murió de melanoma a los 22 años. ¿Cuál es el diagnóstico más probable? Describe el mecanismo molecular que explica la fotosensibilidad extrema y el riesgo oncológico. ¿Qué análisis genético confirmaría el diagnóstico y permitiría el consejo genético familiar?

2. Una mujer de 42 años con cáncer de ovario de alto grado recibe carboplatino y paclitaxel como primera línea. La paciente responde inicialmente pero recae a los 14 meses. Se solicita un análisis de variantes en genes de reparación del ADN. Se detecta una mutación *BRCA2* c.5946delT (frameshift, patogénica). Explica por qué las mutaciones en *BRCA2* predisponen al cáncer de ovario y cómo la deficiencia de HR impacta la sensibilidad a compuestos de platino.

¿Qué tratamiento dirigido podría ser más apropiado en la recaída y cuál es su fundamento mecanístico?

4.9 Glosario

ADN polimerasa *δ*/*ε* ADN polimerasas eucariotas que replican la cromatina con alta fidelidad: pol *ε* actúa en la cadena líder y pol *δ* en la cadena rezagada; ambas poseen actividad correctora (*proofreading*) 3'→5'.

APE1 (AP endonucleasa 1) Endonucleasa que corta la cadena de ADN en los sitios abasic (AP) generados por las ADN glicosilasas en el proceso BER; componente central de la respuesta al daño oxidativo del ADN.

BRCA1/BRCA2 Proteínas supresoras de tumores que coordinan la reparación por recombinación homóloga; BRCA2 carga la recombinasa RAD51 al ADN de cadena simple; sus mutaciones germinales predisponen a cáncer de mama y ovario hereditarios.

Caperuza 5' (Cap) Estructura 7-metilguanosina añadida cotranscripcionalmente al extremo 5' del ARNm; protege contra degradación 5'→3' y es reconocida por el factor eIF4E para iniciar la traducción.

eIF4E Factor de iniciación de la traducción que reconoce la caperuza 5' del ARNm eucariota; frecuentemente sobreexpresado en tumores; diana de inhibición terapéutica con ribavirin y análogos.

Espliceosoma Complejo de 5 snRNPs (U1, U2, U4, U5, U6) + proteínas SR que cataliza la escisión de intrones y la unión de exones en el pre-ARNm mediante dos transesterificaciones secuenciales.

Frameshift Mutación por inserción o deleción de un número de nucleótidos no múltiplo de 3 que desplaza el marco de lectura del ribosoma, alterando todos los aminoácidos aguas abajo de la mutación.

NMD (*Nonsense-Mediated Decay*) Mecanismo de vigilancia del ARNm que degrada los transcritos que contienen codones de parada prematuros, evitando la síntesis de proteínas truncadas dominantes negativas.

OLAPARIB (inhibidor de PARP) Fármaco que inhibe la enzima PARP, responsable de la reparación BER de roturas de cadena simple; en células con deficiencia de BRCA1/2 (incapaces de HR), la inhibición de PARP causa letalidad sintética; aprobado para cáncer de ovario y mama con mutación BRCA.

Posición wobble (tambaleo) Tercera posición del codón, donde el emparejamiento codón-anticodón es menos estricto; permite a un ARNt reconocer más de un codón sinónimo, siendo la base molecular de la degeneración del código genético.

IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) Elemento de ARN estructurado en la región 5'-UTR de ciertos ARNm virales y celulares que recluta el ribosoma de forma cap-independiente; explotado por virus como poliovirus para traducir su genoma durante el estrés celular.

miARN (microARN) ARN no codificante de ~22 nt que reprime la traducción o induce la degradación de ARNm diana mediante complementariedad parcial con su región 3'-UTR; reguladores postranscripcionales de amplio espectro con implicaciones en cáncer e inmunomodulación.

mTOR (*mechanistic Target of Rapamycin*) Proteína kinasa central de la vía PI3K/AKT/mTOR; coordina la síntesis proteica y el crecimiento celular fosforilando 4E-BP1 y S6K; sobreactivada en numerosos cánceres; diana de rapamicina y análogos (everolimus, temsirolimus).

Sitio AP (abasic site) Posición en el ADN donde la base nitrogenada ha sido eliminada por hidrólisis espontánea (depurinación) o por acción de una ADN glicosilasa; intermedio clave en el proceso BER; potencialmente mutagénico si no se repara.

XPC Proteína del complejo de reconocimiento de daño en NER que detecta la distorsión de la doble hélice causada por dímeros de timina y aductos químicos; inicia el reclutamiento del factor TFIIH para la apertura del ADN en el sitio de lesión.

4.10 Resumen

El código genético, descifrado entre 1961 y 1967, es el diccionario de 64 codones que traduce la información nucleotídica en secuencia de aminoácidos. Sus propiedades —degeneración, no solapamiento, ausencia de puntuación y universalidad— tienen consecuencias directas sobre los efectos de las mutaciones: las mutaciones sinónimas no alteran la proteína gracias a la degeneración; las mutaciones

missense, nonsense y frameshift producen efectos crecientes en gravedad. La replicación semiconservativa, demostrada por Meselson y Stahl (1958), garantiza la transmisión fiel del genoma usando miles de orígenes de replicación simultáneos en eucariotas.

La integridad del genoma depende de múltiples sistemas de reparación que operan sobre tipos distintos de lesiones: BER para bases oxidadas o desaminadas, NER para lesiones voluminosas que distorsionan la hélice (dímeros de timina), MMR para emparejamientos erróneos post-replicativos, y HR/NHEJ para las peligrosas roturas de doble cadena. Los defectos en estos sistemas producen síndromes de susceptibilidad al cáncer de alta relevancia diagnóstica: xeroderma pigmentoso (NER), síndrome de Lynch (MMR) y cánceres BRCA (HR). La deficiencia de HR en tumores con mutación BRCA1/2 puede explotarse terapéuticamente mediante inhibidores de PARP por el mecanismo de letalidad sintética.

La transcripción eucariota produce un pre-ARNm que es extensamente procesado (capping 5', splicing, poliadenilación 3') antes de ser exportado al citoplasma. El splicing alternativo multiplica la capacidad codificante del genoma: más del 95 % de los genes humanos multiexónicos generan múltiples isoformas. La traducción en los ribosomas 80S convierte la secuencia de codones en proteínas mediante los ciclos de iniciación, elongación y terminación, proceso que es el blanco terapéutico de numerosos antibióticos que explotan las diferencias estructurales entre ribosomas bacterianos (70S) y eucariotas (80S).

Más allá del dogma central clásico, la regulación postranscripcional por microARN añade una capa de control: los miARN reprimen la traducción de ARNm diana mediante emparejamiento con la región 3'-UTR, con relevancia oncológica creciente. La regulación de la síntesis proteica por la vía mTOR y la respuesta al estrés celular ilustran que la traducción es activamente orquestada en respuesta al entorno metabólico. Para el BQF en el laboratorio molecular, el conocimiento integrado del dogma central —desde la fidelidad de la replicación hasta la regulación de la traducción— es la base para interpretar los mecanismos de resistencia a quimioterápicos, la acción de antibióticos y los nuevos biomarcadores moleculares del cáncer (Strachan & Read, 2019).

CAPÍTULO V

5 PRINCIPIOS DE HERENCIA GENÉTICA

Los capítulos anteriores describieron las moléculas de la herencia y los procesos que las copian, transcriben y traducen. Este capítulo cierra la primera unidad con la pregunta central de la genética: ¿cómo se transmiten los genes de una generación a la siguiente? Las leyes de Mendel, formuladas a partir de experimentos con guisantes en el siglo XIX y redescubiertas a principios del XX, proveen el marco formal para entender la herencia en términos estadísticos; la biología molecular del siglo XX explicó por qué estas leyes se cumplen a nivel de cromosomas y pares alélicos.

5.1 Introducción

La herencia genética es el proceso por el cual los rasgos biológicos se transmiten de padres a hijos mediante la transferencia del material genético. Gregor Mendel (1866) demostró mediante cruzamientos sistemáticos en guisantes (*Pisum sativum*) que la herencia no era un proceso de «mezcla» continua sino de transmisión discreta de unidades —los factores hereditarios, hoy llamados **alelos**— que segregan en la formación de los gametos y se recombinan en la fertilización (Nussbaum et al., 2016).

La redescubierta de las leyes de Mendel en 1900 (de Vries, Correns, Tschermak) coincidió con la observación citológica de que los cromosomas se comportan exactamente como se comportarían los factores de Mendel. La síntesis de la teoría cromosómica de la herencia

por Sutton y Boveri (1902–1903) integró la genética formal con la biología celular, y los experimentos de Morgan con *Drosophila melanogaster* en las siguientes décadas establecieron el ligamiento genético y el mapeo cromosómico, sentando las bases de la genómica moderna (Strachan & Read, 2019).

Para el BQF, los principios mendelianos son el sustento conceptual de aplicaciones diagnósticas directas: el análisis de árboles genealógicos, el cálculo de riesgos de recurrencia en familias con enfermedades genéticas, el sistema abo de grupos sanguíneos como ejemplo de alelos múltiples y codominancia en el banco de sangre, el equilibrio de HardyWeinberg para estimar frecuencias de portadores en la población, y la comprensión del tamizaje neonatal como herramienta de salud pública (Jorde et al., 2020).

5.2 Objetivos de Aprendizaje

1. Definir los conceptos fundamentales de la genética mendeliana: gen, alelo, locus, genotipo, fenotipo, homocigoto, heterocigoto, dominancia.

2. Aplicar la primera y segunda ley de Mendel para predecir proporciones genotípicas y fenotípicas de cruces mono y dihíbridos usando cuadros de Punnett.

3. Distinguir los tipos de dominancia (completa, incompleta, codominancia) con ejemplos clínicamente relevantes, incluyendo el sistema ABO.

4. Calcular frecuencias genotípicas a partir del equilibrio de Hardy-Weinberg para estimar la prevalencia de portadores de enfermedades autosómicas recesivas.

5. Explicar el ligamiento genético y el concepto de mapa genético (centimorgan) como medida de distancia entre loci.

6. Relacionar los patrones de herencia mendeliana con sus aplicaciones en banco de sangre, tamizaje neonatal y consejo genético.

Preguntas de Enfoque

1. ¿Por qué los alelos del sistema ABO son un ejemplo de dominancia múltiple y codominancia simultáneamente?

2. ¿Cómo la pleiotropía de un gen puede hacer que una sola mutación produzca múltiples síntomas en órganos diferentes?

3. ¿Cuál es la diferencia entre penetrancia y expresividad variable, y por qué es importante distinguirlas en la práctica clínica del consejo genético?

4. ¿Por qué el ligamiento genético viola la segunda ley de Mendel? ¿Cuándo la viola más y cuándo la viola menos?

5. Si la frecuencia del alelo recesivo para la PKU en una población es del 1 %, ¿qué proporción de la población será portadora según Hardy-Weinberg?

5.3 Conceptos fundamentales de genética mendeliana

5.3.1 Terminología esencial

Gen Unidad funcional de la herencia; secuencia de ADN que ocupa un locus definido en un cromosoma y cuya expresión produce un carácter observable o una molécula funcional (Nussbaum et al., 2016).

Alelo Variante de secuencia de un gen que puede encontrarse en el mismo locus. Los individuos diploides tienen dos alelos por locus.

Locus Posición física definida de un gen en un cromosoma, especificada por coordenadas genómicas (p.ej., *PAH*: cromosoma 12q23.2).

Genotipo Constitución alélica de un individuo en un locus o en el conjunto del genoma.

Fenotipo Manifestación observable del genotipo; resultado de la interacción genotipo–ambiente. El mismo genotipo puede producir fenotipos diferentes según el ambiente (norma de reacción).

Homocigoto Individuo con dos alelos idénticos en un locus (ej.: AA o aa).

Heterocigoto Individuo con dos alelos diferentes en un locus (ej.: Aa).

Dominancia El alelo dominante (A) determina el fenotipo del heterocigoto (Aa = fenotipo A); el alelo recesivo (a) solo se expresa en homocigosis (Strachan & Read, 2019).

5.4 Las leyes de Mendel

5.4.1 Primera ley: Principio de la segregación

Los dos alelos de un locus en un individuo se **segregan** durante la formación de los gametos, de modo que cada gameto recibe un solo alelo de ese locus. En la fertilización, los gametos del padre y la madre se combinan aleatoriamente restaurando la diploidía (Watson et al., 2014).

Fundamento cromosómico: en la meiosis I, los cromosomas homólogos —cada uno portando un alelo del locus— se separan hacia polos opuestos en la anafase I.

Cruce monohíbrido y cuadro de Punnett

El cuadro de Punnett es la herramienta visual estándar para predecir proporciones genotípicas. Para el cruce *Aa* × *Aa*:

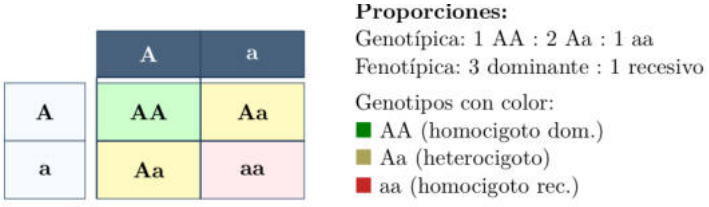


Figura 13. Cuadro de Punnett para el cruce monohíbrido Aa × Aa.

Las proporciones genotípicas resultantes son 1:2:1 (AA:Aa:aa) y la proporción fenotípica es 3:1 (dominante:recesivo) cuando hay dominancia completa. Elaboración propia basada en (Nussbaum et al., 2016).

Si se cruza un individuo homocigoto dominante (AA) × homocigoto recesivo (aa):

*F*1 : todos *Aa* (genotipo 100 % heterocigoto; fenotipo dominante)

*F*1 × *F*1 = *Aa* × *Aa* ⇒ 1 4 *AA* : ²

4 *Aa* : ¹

4 *aa* ⇒fenotipo 3:1

5.4.2 Segunda ley: Principio de la distribución independiente

Los alelos de dos loci en cromosomas *no homólogos* se distribuyen de forma **independiente** en la formación de los gametos, produciendo todas las combinaciones posibles de alelos con igual frecuencia (Karp et al., 2019).

Fundamento cromosómico: en la meiosis I, la orientación de los bivalentes en la placa metafásica es aleatoria, generando gametos con todas las combinaciones posibles de cromosomas maternos y paternos.

El cruce dihíbrido *AaBb* × *AaBb* produce una proporción fenotípica **9:3:3:1** en la *F*2:

9 *A_B_* : 3 *A_bb* : 3 *aaB_* : 1 *aabb*

Concepto Clave

Las leyes de Mendel se aplican rigurosamente cuando: (1) los loci están en cromosomas no homólogos (segregación independiente), (2) los alelos muestran dominancia completa, (3) la fertilización es

aleatoria, y (4) la muestra es suficientemente grande. El ligamiento genético y los tipos alternativos de dominancia constituyen los principales alejamientos de estos supuestos (Nussbaum et al., 2016).

5.5 Tipos de dominancia

5.5.1 Dominancia completa

El heterocigoto *Aa* tiene el mismo fenotipo que el homocigoto dominante *AA*. El alelo *a* no produce producto funcional o produce un producto sin efecto detectable sobre el fenotipo en dosis simple. La mayoría de las enfermedades autosómicas dominantes son causadas por haploinsuficiencia —una sola copia funcional no es suficiente— o por efecto dominante negativo —el alelo mutado interfiere con el producto del alelo silvestre (Strachan & Read, 2019).

5.5.2 Dominancia incompleta

El heterocigoto presenta un fenotipo intermedio entre los dos homocigotos. La proporción fenotípica en la F2 es 1:2:1. Ejemplo clínico: la **betatalasemia**. Los homocigotos tienen talasemia mayor (grave, transfusión-dependiente), los heterocigotos tienen talasemia menor (rasgo de portador con anemia microcítica leve) (Nussbaum et al., 2016).

5.5.3 Codominancia

Ambos alelos se expresan simultáneamente en el heterocigoto, produciendo un fenotipo que exhibe los rasgos de ambos alelos. La proporción fenotípica en la F2 también es 1:2:1 pero el heterocigoto es

fenotípicamente distinto de ambos homocigotos. El ejemplo paradigmático es el **sistema ABO de grupos sanguíneos**.

¡Importante!

Un error conceptual frecuente es confundir dominancia incompleta con codominancia. En la **dominancia incompleta**, el heterocigoto tiene un fenotipo cuantitativamente intermedio (como la anemia leve en el portador de talasemia). En la **codominancia**, ambos alelos se expresan plenamente en el heterocigoto de forma distinguible (como los dos tipos de antígenos en el grupo AB). La distinción es fundamental para el consejo genético: un portador de talasemia no tiene los eritrocitos del tipo A y del tipo B, sino eritrocitos con características propias de la heterocigosis (Nussbaum et al., 2016).

5.6 Alelos múltiples y sistema ABO

La mayoría de los loci en las poblaciones existen como múltiples alelos. El sistema abo de grupos sanguíneos es un ejemplo de tres alelos en el locus 9q34.2:

Alelo *I^(A)*: codifica la glucosiltransferasa A (*α*-1,3-N-acetilgalactosamina transferasa), que añade N-acetilgalactosamina al antígeno H. Alelo *I^(B)*: codifica la glucosiltransferasa B (*α*-1,3-galactosiltransferasa), que añade galactosa al antígeno H. Alelo *i* (recesivo): no codifica ninguna enzima funcional; el antígeno H queda sin modificar (grupo O) (Harvey, 2019).

Tabla 11. Sistema ABO: genotipos, fenotipos, antígenos y anticuerpos.

Grupo	Genotipos posibles	Antígeno eritrocitario	Anticuerpos séricos	Donante a
A	IAIA o IAi	Antígeno A	Anti-B	A, AB
B	IBIB o IBi	Antígeno B	Anti-A	B, AB
AB	IAIB	Antígenos A y B	Ninguno	AB
O	ii	Ninguno (H)	Anti-A y Anti-B	A, B, AB, O

Fuente: Harvey (2019) y (Nussbaum et al., 2016).

Nota. La especificidad de los anticuerpos anti-A y anti-B es la base de las reacciones transfusionales. Los alelos *I^(A)* e *I^(B)* son codominantes entre sí; ambos son dominantes sobre el alelo recesivo *i*.

Aplicación para el Bioquímico Farmacéutico

El sistema abo tiene aplicación directa en el banco de sangre: la compatibilidad de grupo entre donante y receptor es el primer criterio de seguridad transfusional. El BQF realiza la determinación del grupo abo mediante:

1. **Prueba directa (globular)**: los eritrocitos del paciente se enfrentan a sueros reactivos anti-A y anti-B; la aglutinación indica la presencia del antígeno.

2. **Prueba inversa (sérica de Simonin)**: el suero del paciente se enfrenta a eritrocitos conocidos de grupo A1, B y O; la aglutinación indica la presencia del anticuerpo correspondiente.

La concordancia entre ambas pruebas es el estándar de calidad mínimo. El conocimiento de la genética del sistema abo es esencial para interpretar resultados

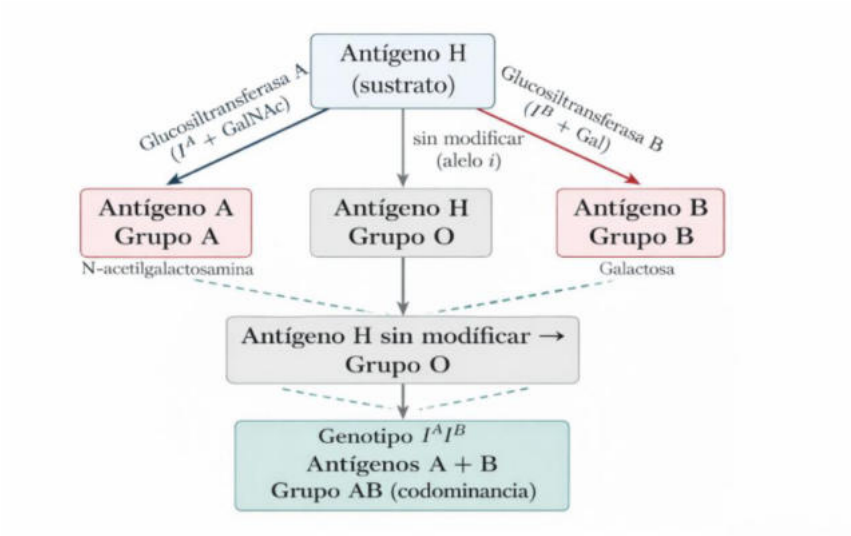


Figura 14. Bioquímica del sistema ABO de grupos sanguíneos.

El antígeno H (precursor de superficie) es modificado enzimáticamente por las glucosiltransferasas codificadas por los alelos *I^(A)* e *I^(B)*. El alelo *i* no produce enzima funcional, dejando el antígeno H sin modificar (grupo O). El genotipo *I^(A)I^(B)* expresa ambas enzimas simultáneamente, produciendo los antígenos A y B (codominancia). Elaboración propia basada en (Harvey, 2019).

discordantes: subgrupos débiles de A (A2, A3, Ax), quimerismo eritrocitario, adquisición de antígeno B en carcinoma de colon, o poliaglutinabilidad por activación de antígenos crípticos (Harvey, 2019).

5.7 Equilibrio de Hardy-Weinberg

El **equilibrio de Hardy-Weinberg** (hw) establece que en una población grande, de apareamiento aleatorio, sin mutación, migración, deriva genética ni selección natural, las frecuencias alélicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación (Jorde et al., 2020).

5.7.1 Las ecuaciones de Hardy-Weinberg

Si p = frecuencia del alelo dominante A y q = frecuencia del alelo recesivo a, entonces:

$p + q = 1$

$p^2 + 2pq + q^2 = 1$

donde:

p^2 = frecuencia de homocigotos dominantes (AA) $2pq$ = frecuencia de heterocigotos (Aa) q^2 = frecuencia de homocigotos recesivos (aa)

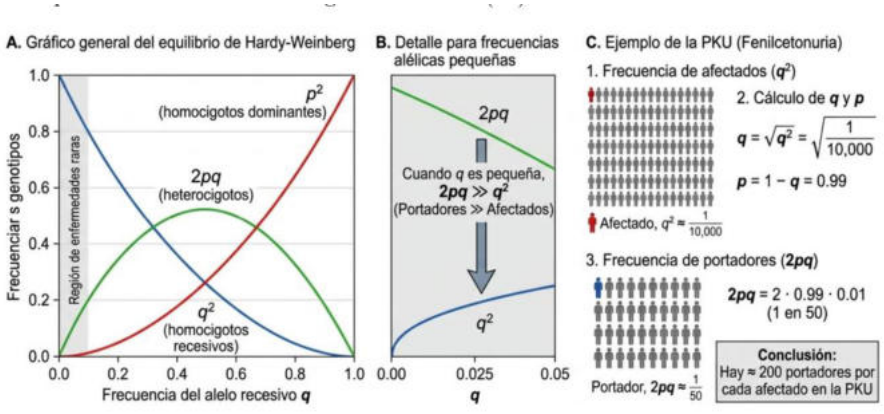


Figura 15. Distribución de frecuencias genotípicas según el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Cuando q (frecuencia del alelo recesivo) es pequeña, la mayoría de los alelos recesivos se encuentran en heterocigotos ($2pq \gg q^2$), lo que explica por qué los portadores son mucho más frecuentes que los afectados en enfermedades raras. El ejemplo de la PKU ilustra este cálculo. Elaboración propia basada en (Jorde et al., 2020).

5.7.2 Aplicación clínica: cálculo de frecuencias de portadores

En la PKU clásica (autosómica recesiva), la incidencia al nacer es ∼1/10.000 recién nacidos en poblaciones europeas. Usando Hardy-Weinberg:

- $q^2 = 1\ 10{,}000 \Rightarrow q = 1\ 100 \Rightarrow 2pq \approx 2\ 100 = 1$
- 50

Es decir, ∼1 de cada 50 personas en esas poblaciones es portadora del alelo de PKU, sin saberlo. Esta estimación es la base para el consejo

genético en familias con riesgo y para el diseño de programas de tamizaje (Nussbaum et al., 2016).

¿Sabías que. . .?

El equilibrio de Hardy-Weinberg fue formulado independientemente por el matemático británico G. H. Hardy y el médico alemán Wilhelm Weinberg en 1908. Su demostración fue una pieza clave en la síntesis moderna evolutiva, porque explicó por qué los alelos recesivos no «desaparecen» de la población: cuando son raros, la mayoría están ocultos en heterocigotos asintomáticos. La fibrosis quística, con una frecuencia de 1/3.000 en caucásicos ($q \approx 0{,}018$; $2pq \approx 1/28$), es el ejemplo más citado de portador frecuente en Europa (Jorde et al., 2020).

5.8 Pleiotropía y expresividad variable

5.8.1 Pleiotropía

Un gen es **pleiotrópico** cuando su mutación afecta a dos o más rasgos fenotípicos aparentemente no relacionados, porque el producto del gen puede tener funciones en múltiples tejidos o activa cascadas de efectos en serie (Karp et al., 2019).

Ejemplo clínico: la **fenilcetonuria** (pku) es causada por deficiencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa (pah). La acumulación de fenilalanina produce: discapacidad intelectual (el exceso de Phe interfiere con la síntesis de neurotransmisores), hipopigmentación (la Phe compite con la tirosina en la síntesis de melanina), eccema

cutáneo, olor característico en la orina (fenilacetato), y retraso del crecimiento. Un solo gen, múltiples fenotipos (Nussbaum et al., 2016).

Otro ejemplo: el **síndrome de Marfan** (mutaciones en *FBN1*, que codifica la fibrilina- 1) afecta simultáneamente el sistema musculoesquelético (aracnodactilia, escoliosis, extremidades largas), el ocular (luxación del cristalino) y el cardiovascular (dilatación/disección aórtica). El conocimiento de la pleiotropía es esencial en el BQF para anticipar la necesidad de panel de pruebas multisistémico.

5.8.2 Penetrancia

La **penetrancia** es la proporción de individuos portadores de un genotipo causante que expresan el fenotipo correspondiente (Strachan & Read, 2019).

Penetrancia completa: todos los portadores expresan el fenotipo (ej.: síndrome de Marfan, penetrancia >99 %; enfermedad de Huntington, penetrancia 100 %).

Penetrancia incompleta: no todos los portadores expresan el fenotipo; el árbol genealógico puede parecer «saltado». Ejemplo: la polidactilia tiene penetrancia ∼80 %; la neurofibromatosis tipo 2 (NF2) tiene penetrancia ∼95 %.

5.8.3 Expresividad variable

La **expresividad** es la variación en el grado o modo de expresión del fenotipo entre individuos con el mismo genotipo causante. Ejemplo: la

neurofibromatosis tipo 1 (nf1) tiene penetrancia casi completa, pero la expresividad varía enormemente en la misma familia: desde manchas café con leche leves hasta neurofibromas numerosos, gliomas ópticos, o compromiso óseo severo (Turnpenny et al., 2022).

5.9 Ligamiento genético y mapeo

Dos loci en el mismo cromosoma se dice que están **ligados**. Los loci ligados no se distribuyen de forma independiente, violando la segunda ley de Mendel. Sin embargo, el **entrecruzamiento** (*crossing-over*) entre loci ligados durante la meiosis I puede separar alelos que normalmente se heredarían juntos, generando **gametos recombinantes** (Watson et al., 2014).

5.9.1 Distancia de mapa: el centimorgan (cM)

La distancia genética entre dos loci se mide en **centimorgans** (cm): 1 cM corresponde a una frecuencia de recombinación del 1 %, es decir, 1 de cada 100 gametos es recombinante para ese par de loci (Nussbaum et al., 2016):

Loci a >50 cM: se heredan prácticamente de forma independiente, aunque estén en el mismo cromosoma. Loci a <10 cM: raramente se separan; el ligamiento es estrecho y son útiles como marcadores diagnósticos ligados al gen de la enfermedad. Loci a 0 cM: prácticamente nunca recombinantes; heredados siempre juntos como bloque haplotípico.

Los mapas de ligamiento tienen aplicación diagnóstica directa: cuando el gen de la enfermedad es conocido pero demasiado grande para

secuenciar completamente, el análisis de **marcadores ligados** (str flanqueantes) permite diagnóstico indirecto (ligamiento) con probabilidad de error calculable (Strachan & Read, 2019).

¿Sabías que. . . ?

El genoma humano haploide tiene ∼3.300 cM de longitud total de mapa genético, distribuidos en 23 cromosomas. El mapa no es uniforme: las regiones teloméricas tienen tasas de recombinación más altas (hasta 5–6 cM/Mb) y las regiones centroméricas las tienen más bajas (<1 cM/Mb). El cromosoma 1 (el más largo) tiene ∼270 cM. Las mujeres tienen un mapa genético total ∼15 % más largo que los varones (Strachan & Read, 2019).

5.10 Herencia no mendeliana y modificación de las proporciones mendelianas

Numerosos rasgos no siguen los patrones simples de Mendel (Nussbaum et al., 2016):

Herencia poligénica: el fenotipo es determinado por múltiples loci, cada uno con efecto aditivo pequeño. Ejemplos: estatura, color de piel, presión arterial. Producen distribuciones continuas en campana en la población.

Herencia multifactorial: herencia poligénica + influencia ambiental. Ejemplos: diabetes tipo 2, hipertensión, esquizofrenia.

Epistasia: un locus modifica la expresión de otro. Produce proporciones fenotípicas modificadas en la F2 (12:3:1, 9:3:4, 15:1, 9:7, etc.) dependiendo del tipo de interacción.

Caso Clínico

Situación: Una pareja acude al laboratorio de genética antes de un segundo embarazo. Su primer hijo, de 3 años, tiene fenilcetonuria clásica (PKU), confirmada por tamizaje neonatal (Phe >20 mg/dL) y secuenciación del gen *PAH* (c.1222C>T

Tabla 12. Tipos de dominancia y modificaciones de las proporciones mendelianas.

Tipo	Fenotipo del heterocigoto	Ratio F2	Ejemplo clínico
Dominancia completa	= Homocigoto dominante	3:1	Enfermedad de Huntington (AD)
Dominancia incompleta	Intermedio entre homocigotos	1:2:1	Betatalasemia
Codominancia	Ambos fenotipos presentes	1:2:1	Sistema ABO (grupo AB)
Alelos letales	Homocigoto dominante no viable	2:1	Color pelaje agouti (ratón)
Epistasia recesiva	Modificado por 2.º locus	9:3:4	Daltonismo + otros

Fuente: Nussbaum et al. (2016), Karp et al. (2019) y Jorde et al. (2020).

Nota. Las proporciones asumen dominancia completa a menos que se indique.

p.R408W en homocigosis). Ninguno de los progenitores tiene síntomas. Se realizan estudios de genotipificación del gen *PAH* en los padres, confirmando que ambos son portadores (c.1222C>T en heterocigosis).

Preguntas para el análisis:

1. ¿Qué patrón de herencia sigue la PKU clásica? ¿Cómo explicas con terminología genética que los padres son portadores asintomáticos?

2. Usando un cuadro de Punnett, calcula: (a) la probabilidad de que el segundo hijo tenga PKU; (b) la probabilidad de que sea portador asintomático; (c) la probabilidad de que sea genotípicamente normal.
3. ¿Por qué es especialmente importante el diagnóstico precoz de PKU? Relaciona tu respuesta con el concepto de pleiotropía.

En el Laboratorio

Tamizaje neonatal: detección de PKU por espectrometría de masa en tándem (MS/MS) Fundamento: La espectrometría de masa en tándem (MS/MS) permite detectar y cuantificar simultáneamente decenas de metabolitos en una sola gota de sangre en papel de filtro, identificando enfermedades metabólicas como la PKU antes de que aparezcan síntomas.

Protocolo:

1. **Toma de muestra**: gota de sangre de talón del recién nacido entre las 24 y 72 horas de vida; impregnación en papel de filtro especial (tarjeta Guthrie).

2. **Extracción**: un disco de 3,2 mm se extrae con metanol que contiene estándares internos deuterados para cuantificación.

3. **Derivatización**: los aminoácidos se esterizan con n-butanol/HCl para aumentar la volatilidad.

4. **Análisis MS/MS**: el primer cuadrupolo selecciona los iones precursores; el segundo cuadrupolo detecta iones productos específicos de cada aminoácido y acilcarnitina.

5. **Criterio diagnóstico PKU**: fenilalanina >2 mg/dL (en la muestra de papel) + relación Phe/Tir >2.5. Los valores de corte varían por laboratorio; una muestra positiva requiere confirmación con niveles séricos de Phe.

Para el BQF: El control de calidad de los discos de papel de filtro (peso, humedad, tiempo de almacenamiento) es crítico para evitar falsos negativos. La interpretación

del resultado debe integrar el tiempo de vida del recién nacido, el tipo de alimentación y los valores de corte del laboratorio (Nussbaum et al., 2016).

Con los principios de herencia mendeliana establecidos, el capítulo 6 profundizará en los patrones de herencia clínica monogénica — autosómica dominante, recesiva, ligada al X, mitocondrial— con ejemplos clínicos directamente relevantes para el diagnóstico genético.

Conceptos Clave

Alelo Variante de secuencia de un gen que puede encontrarse en un locus específico; los individuos diploides tienen dos alelos por locus (uno en cada cromosoma homólogo).

Centimorgan (cM) Unidad de distancia genética: 1 cM = 1 % de frecuencia de recombinación entre dos loci ligados; mapea la proximidad relativa de genes en el mismo cromosoma.

Codominancia Tipo de dominancia en que ambos alelos se expresan simultáneamente en el heterocigoto de forma distinguible; ni uno es dominante sobre el otro.

Equilibrio de Hardy-Weinberg Principio poblacional que establece que las frecuencias genotípicas p^2, $2pq$ y q^2 permanecen constantes si se cumplen sus supuestos; herramienta para estimar frecuencias de portadores de enfermedades recesivas.

Expresividad Variación en el grado de expresión del fenotipo entre distintos individuos portadores del mismo genotipo causal; diferente de la penetrancia (que mide quién expresa o no, no cuánto).

Ligamiento genético Tendencia de loci en el mismo cromosoma a heredarse juntos; viola la segunda ley de Mendel; el crossing-over reduce el ligamiento con la distancia.

Penetrancia Proporción de individuos con un genotipo que manifiestan el fenotipo correspondiente; puede ser completa (100 %) o incompleta (<100 %).

Pleiotropía Capacidad de un solo gen de afectar múltiples rasgos fenotípicos aparentemente no relacionados debido a las múltiples funciones de su producto génico.

Primera ley de Mendel Ley de la segregación: los dos alelos de un locus se separan durante la formación de los gametos, cada gameto recibiendo un solo alelo.

Segunda ley de Mendel Ley de la distribución independiente: los alelos de loci en cromosomas distintos se distribuyen de forma independiente en los gametos; no aplica a loci ligados.

Tamizaje neonatal Programa de cribado poblacional en recién nacidos para detección precoz de enfermedades metabólicas, endocrinas o genéticas antes de que aparezcan síntomas, permitiendo tratamiento preventivo.

Actividades de Consolidación

Actividad 1. labelindent **Cuadros de Punnett.** Resuelve los siguientes cruces y calcula las proporciones fenotípicas:

(a) *Aa* × *Aa* con dominancia completa;

(b) *I^(A)i* × *I^(B)i* para el sistema ABO (lista los cuatro fenotipos posibles con sus probabilidades);

(c) *AaBb* × *Aabb* para dos loci independientes con dominancia completa.

Actividad 2. labelindent **Aplicación de Hardy-Weinberg.** La frecuencia de fibrosis quística en recién nacidos caucásicos es 1/3.000. Calcula:

(a) la frecuencia del alelo recesivo q;

(b) la frecuencia de portadores ($2pq$);

(c) si una pareja de portadores desconoce su estado, ¿cuál es la probabilidad de que su hijo tenga FC? Compara con la probabilidad para un individuo de la población general.

Actividad 3. labelindent **Sistema ABO en banco de sangre.** Simula una prueba de tipificación ABO con las siguientes observaciones: Muestra 1: aglutinación con anti-A, sin aglutinación con anti-B; en prueba inversa, el suero aglutina eritrocitos B pero no A. Determina el grupo y el genotipo posible del donante. ¿Cuáles son los grupos compatibles para transfusión?

Actividad 4. labelindent **Análisis de árbol genealógico.** Dado un árbol genealógico donde el abuelo materno está afectado, la madre es portadora asintomática, y un hijo varón está afectado: determina el patrón de herencia más probable. Calcula la probabilidad de que el próximo hijo varón de esta madre esté afectado.

5.11 Preguntas de Autoevaluación

A. Opción múltiple

1. Si ambos padres tienen grupo sanguíneo A (*I^(A)I^(A)* y *I^(A)i* respectivamente), ¿cuál es la probabilidad de que un hijo tenga grupo O?

(a) 25 %

(b) **0 % — ningún progenitor puede aportar el alelo *i* en homocigosis en este cruce**

(c) 50 %

(d) 12.5 %

2. En el equilibrio de Hardy-Weinberg, si la frecuencia de una enfermedad autosómica recesiva es 1/10.000, ¿cuál es la frecuencia aproximada de portadores?

(a) 1/10.000

(b) 1/5.000

(c) **≈1/50**

(d) 1/100

3. La segunda ley de Mendel (distribución independiente) solo se cumple para:

(a) Todos los genes de una misma especie

(b) Genes adyacentes en el mismo cromosoma

(c) **Genes en cromosomas distintos o muy lejanos en el mismo cromosoma**

(d) Solo los genes con dominancia completa

4. Un gen cuya mutación provoca sordera, pigmentación anómala del iris y problemas de equilibrio vestibular es un ejemplo de:

(a) Epistasia

(b) Codominancia

(c) **Pleiotropía**

(d) Penetrancia incompleta

5. ¿Qué proporción de individuos con genotipo *Aa* expresará el fenotipo si la penetrancia es del 60 %?

(a) 100 %

(b) 40 %

(c) **60 %**

(d) 25 %

6. En el cruce dihíbrido *AaBb* × *AaBb*, la proporción de individuos con genotipo *aabb* es:

(a) 1/9

(b) 3/16

(c) **1/16**

(d) 9/16

7. ¿Qué anticuerpos posee en su suero una persona del grupo sanguíneo B?

(a) Solo anti-B

(b) Ninguno

(c) Anti-A y anti-B

(d) **Anti-A**

8. El *crossing-over* entre dos loci ligados produce gametos recombinantes. La frecuencia de estos gametos:

(a) Siempre es del 50 %, independientemente de la distancia

(b) Disminuye con la distancia entre los loci

(c) **Aumenta con la distancia entre los loci (hasta un máximo del 50 %)**

(d) Solo ocurre en loci en cromosomas sexuales

B. Verdadero o Falso — justifique su respuesta

1. «Un individuo con grupo sanguíneo AB puede ser donante de sangre completa para cualquier receptor.» *Falso.* Un individuo del grupo AB

tiene en su suero anticuerpos *ninguno* (anti-A ni anti-B), por lo que podría recibir de cualquier grupo (receptor universal de eritrocitos). Sin embargo, el grupo AB *no* es donante universal de sangre completa, porque el plasma del grupo AB no contiene anticuerpos contra A ni B, pero los eritrocitos AB tienen antígenos A y B que serán atacados por los anticuerpos del receptor de grupos A, B u O. Solo puede donar glóbulos rojos a otro receptor AB.

2. «La penetrancia incompleta y la expresividad variable son el mismo fenómeno.» *Falso.* Son fenómenos distintos. La **penetrancia** pregunta si el individuo con el genotipo expresa o no el fenotipo (sí o no). La **expresividad** pregunta en qué grado lo expresa (leve, moderado, severo). Todos los individuos con NF1 la expresan (penetrancia alta), pero el grado varía enormemente (expresividad variable). En la polidactilia, no todos los portadores tienen dedos extra (penetrancia incompleta).

3. «Las frecuencias genotípicas según Hardy-Weinberg se mantienen constantes en todas las poblaciones reales a lo largo del tiempo.» *Falso.* El equilibrio de Hardy-Weinberg es un modelo teórico que asume: población infinita, apareamiento aleatorio, ausencia de mutación, migración, deriva y selección. Ninguna población real cumple estrictamente todos estos supuestos. La hw es útil como punto de referencia para detectar desviaciones que indican que alguna fuerza evolutiva está actuando, pero las frecuencias genotípicas reales fluctúan.

C. Análisis de Casos

1. Una pareja desea saber el riesgo de tener un hijo con fenilcetonuria. La mujer tiene un hermano con PKU; el hombre no tiene antecedentes familiares. Usando Hardy-Weinberg (incidencia de PKU en la región: 1/10.000): (a) ¿cuál es la probabilidad de que la mujer sea portadora? (b) ¿cuál es la probabilidad de que el hombre sea portador? (c) ¿cuál es el riesgo final de que el próximo hijo tenga PKU? Muestra el cálculo completo.

2. En el laboratorio de banco de sangre, llega una muestra con resultado discordante: la prueba directa indica grupo A (aglutinación con anti-A), pero la prueba inversa no aglutina ni los eritrocitos A1 ni los B. Propone al menos dos causas técnicas o biológicas que podrían explicar esta discordancia y describe el paso a seguir para resolver cada una.

5.12 Glosario

Cruce dihíbrido Cruce entre dos individuos doble heterocigotos (AaBb × AaBb); produce una proporción 9:3:3:1 en la F2 bajo dominancia completa e independencia de los loci.

Cruce testigo (*backcross*) Cruce de un individuo de genotipo desconocido con el doble recesivo (aabb); permite determinar directamente la frecuencia de cada clase genotípica.

Dominancia incompleta Tipo de dominancia en que el heterocigoto tiene un fenotipo cuantitativamente intermedio entre los dos homocigotos.

Epistasia Interacción entre dos loci en que los alelos de uno suprimen o modifican la expresión de los alelos del otro; produce proporciones fenotípicas modificadas en la F2.

Gameto Célula reproductora haploide (espermatozoide u óvulo) producida por la meiosis; porta un alelo por locus.

Haploinsuficiencia Condición en que una sola copia funcional de un gen es insuficiente para producir el fenotipo normal; mecanismo común de las enfermedades autosómicas dominantes.

Herencia poligénica Herencia de un carácter determinado por múltiples loci con efectos aditivos individuales; produce distribuciones fenotípicas continuas (en campana) en la población.

Locus Posición física de un gen en un cromosoma; especificada en coordenadas genómicas o en el mapa de ligamiento.

Norma de reacción Rango de fenotipos que puede producir un genotipo determinado en función del ambiente; ilustra la interacción genotipo-ambiente en la producción del fenotipo.

Recombinación Proceso de intercambio de segmentos de cromátidas no hermanas durante el crossing-over en la meiosis I; genera nuevas combinaciones alélicas (gametos recombinantes).

5.13 Resumen

Los principios de la herencia genética establecidos por Mendel proveen el marco formal para predecir cómo los alelos se distribuyen en los descendientes. La primera ley (segregación) refleja la separación

de los cromosomas homólogos en la meiosis I; la segunda ley (distribución independiente) refleja la orientación aleatoria de los bivalentes en la placa metafásica, aplicable solo a loci en cromosomas no homólogos o muy distantes. Los cuadros de Punnett son la herramienta visual para calcular proporciones genotípicas y fenotípicas, con la proporción 3:1 como resultado de referencia para la dominancia completa y 1:2:1 para dominancia incompleta y codominancia.

Los tipos de dominancia modulan la relación genotipo-fenotipo: el sistema ABO es un ejemplo ejemplar de codominancia entre *I^(A)* e *I^(B)* (el heterocigoto *I^(A)I^(B)* expresa ambos antígenos) y de dominancia completa de ambos sobre *i*. El equilibrio de Hardy-Weinberg es una herramienta poblacional de alto valor práctico: permite estimar la frecuencia de portadores de enfermedades recesivas a partir de la incidencia observada, con aplicación directa en consejo genético y diseño de programas de tamizaje neonatal.

La pleiotropía, la penetrancia variable y la expresividad variable complejizan el análisis clínico de los árboles genealógicos, pero el conocimiento de sus mecanismos moleculares permite interpretar la variabilidad fenotípica observada en familias con la misma mutación. El ligamiento genético y el mapeo por centimorgans proveen herramientas para localizar genes en los cromosomas, base de los estudios de asociación genómica de amplia cobertura (GWAS) que identifican loci de enfermedades complejas. Para el BQF, estos principios son la base conceptual del banco de sangre, el tamizaje

neonatal y la interpretación de los informes de secuenciación genómica.

CAPÍTULO VI

6 HERENCIA GENÉTICA Y BASES CROMOSÓMICAS DE LA VARIACIÓN

6.1 Patrones de Herencia y Herencia No Clásica

El capítulo 5 estableció los principios formales de la herencia mendeliana. Sin embargo, en la práctica clínica el genetista o el bioquímico farmacéutico se enfrenta a árboles genealógicos reales cuya interpretación requiere reconocer patrones específicos de herencia: ¿se trata de una enfermedad autosómica dominante o recesiva? ¿El gen está en el cromosoma X? ¿La herencia salta generaciones o afecta solo a varones? ¿Podría ser mitocondrial? Este capítulo sistematiza los patrones de herencia monogénica y presenta las formas de herencia no clásica que complican el diagnóstico.

6.2 Introducción

Los patrones de herencia son la firma fenotípica que cada tipo de herencia genética deja en los árboles genealógicos de las familias afectadas. Reconocerlos es la primera competencia del profesional que trabaja con enfermedades genéticas, y es el punto de partida para el consejo genético: calcular el riesgo de recurrencia para los familiares de un paciente afectado, decidir qué prueba molecular es la más apropiada, y orientar sobre el diagnóstico prenatal o preimplantacional (Turnpenny et al., 2022).

Las enfermedades monogénicas —causadas por mutaciones en un solo gen— siguen patrones de herencia predecibles. Los cuatro patrones

clásicos son: autosómica dominante, autosómica recesiva, ligada al X recesiva, y ligada al X dominante. Cada uno tiene una «firma» reconocible en el árbol genealógico: proporción de afectados, distribución por sexo, presencia de portadores asintomáticos y riesgo de transmisión vertical u horizontal (Nussbaum et al., 2016). A estos patrones se suman la herencia ligada al Y (holándrica) y la herencia mitocondrial, cada una con características únicas que reflejan la biología del genoma que las sustenta.

Pero la herencia real es frecuentemente más compleja: la herencia mitocondrial sigue la transmisión materna del genoma mitocondrial; la impronta genómica hace que el efecto de una mutación dependa de si se heredó del padre o de la madre; la anticipación genética produce generaciones progresivamente más afectadas por expansión de secuencias

repetidas (Strachan & Read, 2019). El conocimiento de estos fenómenos es indispensable para interpretar correctamente los resultados moleculares en el laboratorio de genética. Para el bioquímico farmacéutico (BQF), este conocimiento se traduce en capacidad de orientar estudios moleculares, interpretar informes de secuenciación y explicar a pacientes y familias el significado de un resultado genético (Jorde et al., 2020).

6.3 Objetivos de Aprendizaje

1. Identificar los patrones de herencia autosómica dominante, autosómica recesiva, ligada al X recesiva y ligada al X dominante a partir de la lectura de un árbol genealógico.

2. Describir los mecanismos moleculares responsables de las diferencias clínicas entre herencia autosómica dominante (haploinsuficiencia, dominancia negativa, ganancia de función) y recesiva.

3. Explicar las características únicas de la herencia mitocondrial y los conceptos de heteroplasmia y efecto umbral en la expresión de enfermedades del ADNmt.

4. Definir los conceptos de impronta genómica y disomía uniparental, con sus ejemplos clínicos (Prader-Willi, Angelman, Beckwith-Wiedemann).

5. Aplicar el análisis de árboles genealógicos para estimar riesgos de recurrencia, identificar portadores y orientar el consejo genético en familias con herencia monogénica.

6.4 Preguntas de Enfoque

1. ¿Por qué en una enfermedad autosómica dominante basta con una sola copia del alelo mutante para producir el fenotipo? ¿En qué se diferencia haploinsuficiencia de dominancia negativa?

2. ¿Por qué la hemofilia A afecta casi exclusivamente a varones si el gen *F8* está en el cromosoma X? ¿En qué circunstancias una mujer podría estar afectada?

3. ¿Cómo es posible que dos hermanos con la misma deleción en 15q11-q13 tengan fenotipos completamente diferentes? ¿Qué mecanismo epigenético lo explica?

4. ¿Qué significa que una enfermedad tenga «herencia materna exclusiva»? ¿Por qué el porcentaje de moléculas mutantes en el ADN mitocondrial influye en la gravedad?

5. En la enfermedad de Huntington, ¿por qué la anticipación es más pronunciada cuando la transmisión ocurre por vía paterna? ¿Qué ocurre con las repeticiones CAG en las células germinales masculinas?

6.5 Herencia autosómica dominante

En la herencia **autosómica dominante** (ad), basta con una sola copia del alelo mutante para que el individuo exprese la enfermedad. El alelo patogénico está en un autosoma (no en un cromosoma sexual) y los afectados son generalmente heterocigotos (Nussbaum et al., 2016). Esta situación contrasta con la recesividad, donde la segunda copia funcional puede compensar el defecto. La dominancia, por tanto, implica que el alelo mutante produce un fenotipo visible incluso en presencia del alelo normal.

6.5.1 Características del árbol genealógico en herencia AD

El árbol genealógico de una familia con enfermedad autosómica dominante muestra una «firma vertical»:

Afectados en *cada* generación (transmisión vertical, generación a generación). Padres afectados transmiten a hijos con riesgo del 50 % por descendiente. Ambos sexos afectados con igual frecuencia (gen en autosoma). En familias con casos aislados (*de novo*), puede no haber historia familiar previa; las mutaciones *de novo* son frecuentes en enfermedades donde la forma grave reduce el éxito reproductivo.

Penetrancia incompleta y expresividad variable pueden simular «saltos» generacionales, aunque la regla general es la transmisión continua (Griffiths et al., 2020).

6.5.2 Mecanismos moleculares de dominancia

¿Por qué una sola copia mutante produce enfermedad si la otra copia es normal? Los mecanismos son tres y tienen implicaciones clínicas distintas:

1. **Haploinsuficiencia**: una sola copia funcional del gen no produce suficiente proteína para la función normal. Ejemplos: mutaciones en genes de factores de transcripción (*PAX6* en aniridia, *NF1* en neurofibromatosis tipo 1) y en genes estructurales que deben alcanzar un umbral de concentración. La haploinsuficiencia es el mecanismo más común en enfermedades AD de inicio tardío.

2. **Efecto de dominancia negativa**: la proteína mutante interfiere activamente con la función de la proteína normal producida por el alelo salvaje, generalmente porque forman multímeros. Ejemplo paradigmático: el colágeno tipo I en osteogénesis imperfecta (*COL1A1/COL1A2*). Una sola cadena α defectuosa contamina toda la triple hélice de colágeno, produciendo el fenotipo completo incluso con el 50 % de cadenas normales. Este efecto explica por qué la forma dominante es mucho más grave que la forma recesiva (Strachan & Read, 2019).

3. **Ganancia de función** (*gain of function*): la proteína mutante adquiere una actividad nueva y tóxica, completamente independiente

de la función normal de la proteína. Ejemplo clásico: la huntingtina con expansión de poliglutaminas (CAG repeticiones) en la enfermedad de Huntington (*HTT*). La huntingtina mutante forma agregados intracelulares que son tóxicos para las neuronas del cuerpo estriado (Turnpenny et al., 2022). Otro ejemplo es la acondroplasia: la mutación Gly380Arg en *FGFR3* genera un receptor hiperactivo que inhibe la proliferación de condrocitos.

Concepto Clave

La distinción entre haploinsuficiencia, dominancia negativa y ganancia de función no es solo académica: tiene implicaciones terapéuticas. La haploinsuficiencia podría teóricamente corregirse con terapia de reemplazo génico; la ganancia de función requiere silenciar el alelo mutante (ARN antisentido, siARN), no agregar el normal. En la enfermedad de Huntington, los ensayos clínicos con oligonucleótidos antisentido apuntan específicamente a reducir la expresión del alelo *HTT* mutante (Nussbaum et al., 2016).

6.5.3 Penetrancia y expresividad en herencia AD

Dos conceptos son fundamentales para interpretar árboles genealógicos con herencia AD:

Penetrancia: proporción de individuos que portando el genotipo causante *expresan* el fenotipo. Una penetrancia del 80 % significa que el 20 % de portadores son fenotípicamente normales, lo que puede simular «saltos» generacionales.

Expresividad variable: variación en el grado o tipo de manifestaciones entre individuos con el mismo genotipo. La neurofibromatosis tipo 1 (*NF1*) es el ejemplo más estudiado: algunos afectados tienen solo manchas café con leche, mientras otros desarrollan neurofibromas plexiformes, gliomas ópticos o tumores malignos de la vaina nerviosa.

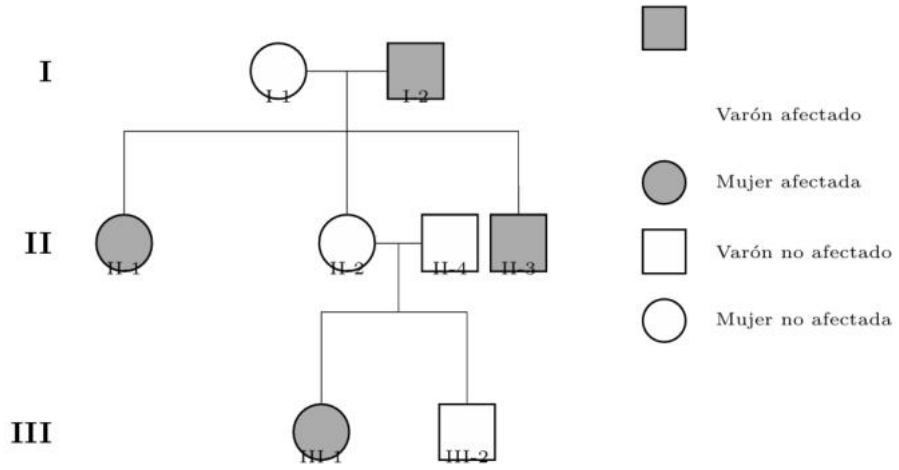


Figura 16. Árbol genealógico típico de herencia autosómica dominante.

El individuo I-2 afectado transmite la enfermedad a II-1 y II-3 (50 % de los hijos); III-1 hereda el alelo dominante de su madre II-2. Cada generación muestra afectados. Elaboración propia.

6.6 Herencia autosómica recesiva

En la herencia **autosómica recesiva** (ar), ambas copias del gen deben estar mutadas para que se exprese la enfermedad. Los portadores heterocigotos son generalmente asintomáticos, porque la copia funcional compensa la defectuosa (Nussbaum et al., 2016). En general,

las enfermedades AR implican pérdida de función enzimática: la célula con una sola copia funcional produce suficiente enzima (> 50 % de la actividad normal es en general suficiente para la función), pero la célula con dos copias mutantes no puede catalizar la reacción metabólica.

6.6.1 Características del árbol genealógico en herencia AR

La firma del árbol genealógico AR es «horizontal»:

Los afectados suelen ser hijos de padres portadores asintomáticos (árbol «horizontal»). Riesgo de 25 % por descendiente si ambos progenitores son portadores (Aa × Aa). El riesgo es mayor en familias consanguíneas: cuando los progenitores comparten ancestros comunes, la probabilidad de que ambos sean portadores del mismo alelo recesivo raro aumenta exponencialmente. Ambos sexos afectados con igual frecuencia (gen en autosoma). Los portadores representan el doble de afectados en familias consanguíneas (coeficiente de endogamia *F*).

6.6.2 Consanguinidad y coeficiente de parentesco

La consanguinidad aumenta el riesgo de enfermedades AR porque incrementa la probabilidad de que ambos progenitores sean heterocigotos para el mismo alelo patogénico heredado de un ancestro común. El **coeficiente de endogamia** (*F*) representa la probabilidad de que los dos alelos de un locus en un individuo sean idénticos por descendencia (*identity by descent*, IBD):

Primos hermanos: $F = 1/16$ Primos de segundo grado: $F = 1/64$ Tío-sobrina: $F = 1/8$

Cuando un gen recesivo tiene una frecuencia alélica q en la población, el riesgo de afectación en hijos de primos hermanos es $q/16+(1-1/16)\,q^2$, significativamente mayor que q^2 para alelos raros (Griffiths et al., 2020).

6.6.3 Ejemplos clínicos de herencia AR

Fibrosis quística (FQ): mutaciones en el gen *CFTR* (cromosoma 7q31); la mutación F508del representa ∼70 % de los alelos causantes en poblaciones europeas; causa acumulación de moco espeso en pulmón, páncreas e intestino. La proteína CFTR es un canal de cloro cuya ausencia impide la hidratación normal de las superficies epiteliales (Strachan & Read, 2019).

Anemia falciforme: mutación puntual Glu6Val en el gen *HBB*; polimerización de la HbS en hipoxia; fenómeno de vaso-oclusión; la heterocigosis (*A/S*) confiere protección relativa frente a malaria — ejemplo clásico de selección heterocigótica.

Fenilcetonuria (pku): deficiencia de fenilalanina hidroxilasa (*PAH*); detectada por tamizaje neonatal; tratada con dieta baja en fenilalanina y, en algunos casos, con sapropterina (BH4), un cofactor que restaura la actividad residual en variantes con sensibilidad a BH4. **Galactosemia clásica**: deficiencia de galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (*GALT*); acumulación de galactosa-1-fosfato tóxica; presentación neonatal con ictericia, hepatomegalia, cataratas y sepsis; tratamiento con dieta libre de lactosa desde las primeras semanas.

Enfermedad de Gaucher (tipo 1): deficiencia de glucocerebrosidasa (*GBA*); acumulación de glucocerebrósido en macrófagos (células de Gaucher); esplenomegalia, hepatomegalia, infiltración ósea; tratable con terapia de reemplazo enzimático (imiglucerasa, velaglucerasa) — modelo de terapia enzimática molecular (Jorde et al., 2020).

¡Importante!

Error frecuente: confundir heterocigoto portador con afectado. En herencia AR, los portadores (Aa) no expresan la enfermedad. Sin embargo, en algunas enfermedades AR con expresividad bioquímica (como la deficiencia parcial de enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial), los heterocigotos pueden tener niveles enzimáticos reducidos al 50%, lo que puede ser clínicamente relevante en condiciones de estrés metabólico. Este fenómeno no convierte la herencia en dominante, pero sí puede tener importancia clínica en ciertos contextos diagnósticos. I II I-1 (Aa) I-2 (Aa) II-1 (AA/Aa) II-2 (Aa) II-3 (aa) II-4 (AA/Aa) Proporciones esperadas: 1/4 AA : 2/4 Aa : 1/4 aa (solo aa afectados) Portado

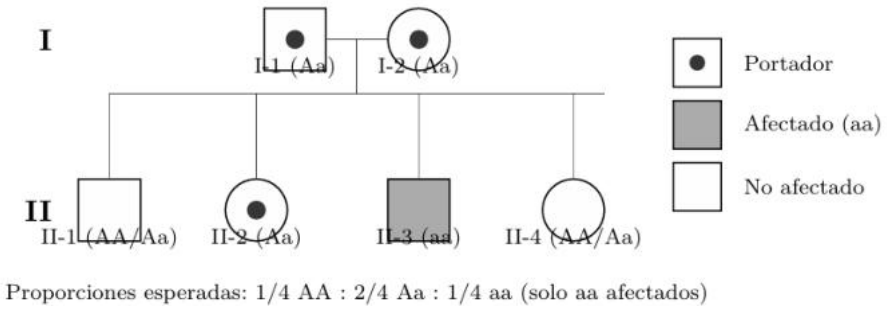


Figura 17. Árbol genealógico típico de herencia autosómica recesiva.

Los progenitores I-1 e I-2 son portadores asintomáticos (Aa). Entre sus cuatro hijos, II-3 es afectado (aa), II-2 es portadora. La probabilidad de afectación por hijo es 25 %. Elaboración propia.

6.7 Herencia ligada al cromosoma X

Los genes ubicados en el cromosoma X tienen un patrón de herencia diferente al de los autosomas, porque las hembras tienen dos copias (XX) pero los varones solo una (xy: son **hemicigotos**) (Turnpenny et al., 2022). El cromosoma Y no porta copias funcionales de la mayoría de genes del X, por lo que los varones no tienen alelo «de respaldo» para los genes ligados al X.

6.7.1 Inactivación del cromosoma X: la hipótesis de Lyon

Un aspecto fundamental de la herencia ligada al X es la **inactivación del cromosoma X** (hipótesis de Lyon, 1961). En los tejidos somáticos femeninos, uno de los dos cromosomas X es inactivado al azar al inicio del desarrollo embrionario (blastocisto), formando la **cromatina de Barr** (cuerpo de Barr) o X inactivo. Este proceso es:

Aleatorio: en cualquier célula precursora, es igual de probable que se inactivo el X materno o el paterno.

Permanente y clonal: una vez inactivado un X, todas las células hijas mantienen el mismo X inactivo.

Mediado por XIST: el gen *XIST* (en el X inactivo) produce un ARN largo no codificante que recubre el cromosoma X inactivo y recluta modificaciones epigenéticas (H3K27me3 por PRC2, metilación del ADN) (Alberts et al., 2022).

Consecuencia para las portadoras de enfermedades ligadas al X: si la inactivación del X ocurre al azar, aproximadamente el 50 % de las células de una portadora expresan el alelo mutante y el 50 % el alelo normal, lo que generalmente produce un fenotipo intermedio o ausente. Sin embargo, si la inactivación se desvía (*skewed X-inactivation*) y predomina la inactivación del X normal, la portadora puede manifestar síntomas (portadora «sintomática»). Esta es la razón por la que algunas mujeres portadoras de distrofia muscular de Duchenne tienen debilidad muscular moderada.

6.7.2 Herencia ligada al X recesiva

Características del patrón:

Las hembras portadoras (*X^(N)X^(m)*) son asintomáticas (el alelo normal en el otro X compensa), salvo inactivación sesgada. Los varones hemicigotos (*X^(m)Y*) que heredan el alelo mutante expresan la enfermedad. **Nunca** hay transmisión de padre afectado a hijo varón (el hijo varón hereda el Y del padre, no el X). Los hijos varones de una

portadora tienen 50 % de riesgo de estar afectados; las hijas tienen 50 % de riesgo de ser portadoras. En el árbol genealógico: varones afectados en generaciones alternas, relacionados a través de hembras portadoras (patrón «abuelo afectado — madre portadora — nieto afectado»).

Ejemplos: **Hemofilia A** (deficiencia de factor VIII, gen *F8*, Xq28); hemofilia B (factor IX, *F9*, Xq27); distrofia muscular de Duchenne (*DMD*, Xp21 — deleciones grandes del gen más grande del genoma humano, 2.4 Mb); daltonismo rojo-verde (*OPN1LW/OPN1MW*, Xq28) (Nussbaum et al., 2016).

6.7.3 Herencia ligada al X dominante

Características:

Las hembras heterocigotas (*X^(M)X^(N)*) *sí* se ven afectadas (a menudo con cuadro más leve que los varones por compensación parcial de la inactivación del X). Los varones hemicigotos (*X^(M)Y*) están afectados, generalmente con mayor severidad. Todos los hijos de un padre afectado son: hijas afectadas (reciben el X del padre) e hijos varones no afectados (reciben el Y del padre). En algunas enfermedades ligadas al X dominante, los varones hemicigotos son *letales en el útero* (solo las hembras sobreviven); el árbol genealógico muestra solo mujeres afectadas con abortos masculinos recurrentes (Strachan & Read, 2019).

Ejemplos: Síndrome de Rett (*MECP2*), raquitismo hipofosfatémico ligado al X (*PHEX*), incontinentia pigmenti (*IKBKG* — letal en varones).

6.7.4 Herencia ligada al Y (holándrica)

Los genes ubicados en la región no recombinante del cromosoma Y (NRY) se transmiten exclusivamente de padre a hijo varón. Son pocos genes con importancia clínica en esta categoría, pero la deleción de regiones AZF (*azoospermia factor*) en el brazo largo del Y (*Yq11*) causa azoospermia no obstructiva (infertilidad masculina). La herencia holándrica produce un patrón único: *todos* los hijos varones del padre están afectados; ninguna hija está afectada ni es portadora.

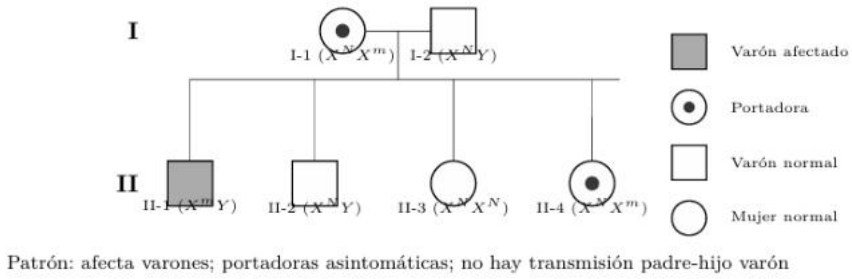


Figura 18. Árbol genealógico de herencia ligada al X recesiva.

La portadora I-1 transmite el alelo mutante al 50 % de sus hijos varones (afectados, *X^(m)Y*) y al 50 % de sus hijas (portadoras, *X^(N)X^(m)*). El padre I-2 no transmite el alelo *X^(m)* a ningún hijo.

Tabla 13. Características comparativas de los patrones de herencia monogénica.

Patrón	Sexo	Portadores	Salto gene-racional	Riesgo por hijo
Autosómica dominante	M = F	Raro (penetrancia incompleta)	Poco frecuente	50 %
Autosómica recesiva	M = F	Sí (heteroci-gotos)	Frecuente	25 %
Ligada al X recesiva	Varones ≫ hembras	Hembras portadoras	Sí	50 % varones; 50 % hembras portadoras
Ligada al X dominante	M y F	Raro	No	50 % (ambos sexos)
Ligada al Y	Solo varones	No	No	100 % hijos varones
Mitocondrial	M y F	Raramente	No	100 % hijos de madre afectada

Fuente: Nussbaum et al. (2016) y Turnpenny et al. (2022).

Nota. AD = autosómica dominante; AR = autosómica recesiva; M = masculino; F = femenino.

6.8 Herencia multifactorial y poligénica

Muchas enfermedades comunes (diabetes tipo 2, hipertensión, esquizofrenia, cardiopatía coronaria, labio leporino) no siguen un patrón mendeliano simple porque son causadas por la interacción de múltiples variantes genéticas de efecto pequeño con factores ambientales (**herencia multifactorial**) (Karp et al., 2019). Este modelo se distingue de la herencia poligénica pura en que incluye explícitamente los factores ambientales como componentes causales.

6.8.1 Modelo umbral de Falconer

El **modelo umbral** de Falconer propone que la susceptibilidad total (genética + ambiental) se distribuye de forma continua en la población como una curva normal, y que los individuos que superan un umbral de susceptibilidad desarrollan la enfermedad. Esto explica:

La enfermedad se agrega en familias pero no sigue proporciones mendelianas. El riesgo de recurrencia para familiares es proporcional al número de familiares afectados y a la gravedad del cuadro índice. El riesgo aumenta en sexos con menor prevalencia (paradoja de Carter): un varón con labio leporino tiene heredabilidad mayor porque el umbral en varones es inferior al umbral en hembras; si una hembra está afectada, implica mayor carga genética (Griffiths et al., 2020).

6.8.2 Heredabilidad

La **heredabilidad** (h^2) mide la proporción de la varianza fenotípica total que es atribuible a varianza genética aditiva. Se estima mediante estudios de gemelos: $h^2 = (rMZ - rDZ)/(1 - rDZ)$ donde rMZ es la concordancia en monocigotos y rDZ en dicigotos. Alta heredabilidad no implica determinismo genético ni que el fenotipo no sea modificable por el ambiente; significa que, *en la población estudiada*, las diferencias genéticas entre individuos explican gran parte de las diferencias fenotípicas (Jorde et al., 2020).

6.9 Herencia mitocondrial

Las mitocondrias poseen su propio genoma circular de 16,569 pb (ADNmt) que codifica 13 proteínas de la cadena respiratoria oxidativa,

22 ARNt y 2 ARNr *mitocondriales*. El ADNmt tiene características únicas que lo diferencian del ADN nuclear (Alberts et al., 2022):

Herencia materna exclusiva: el óvulo aporta prácticamente todas las mitocondrias del zigoto (el espermatozoide contribuye con mitocondrias que son degradadas proteosomalmente tras la fecundación). Las enfermedades mitocondriales se transmiten solo a través de la madre; los hijos de un padre afectado no heredan la enfermedad.

Homoplasmia/heteroplasmia: una célula puede tener miles de copias del ADNmt. Cuando todas las copias son idénticas se habla de **homoplasmia**; cuando coexisten copias normales y mutantes se habla de **heteroplasmia**. El fenotipo clínico depende del porcentaje de moléculas mutantes: existe un **efecto umbral** por debajo del cual la enfermedad no se manifiesta (la energía generada por las mitocondrias con ADNmt normal es suficiente para la función celular). En tejidos de alta demanda energética (músculo esquelético, corazón, neuronas, retina) el umbral se alcanza antes que en tejidos con menor demanda.

Alta tasa de mutación: el ADNmt carece de histonas protectoras, está expuesto al ambiente reductor de la cadena respiratoria (alta producción de especies reactivas de oxígeno) y tiene sistemas de reparación menos eficientes que el ADN nuclear. La tasa de mutación somática del ADNmt es 10–100 veces mayor que la del ADN nuclear.

Segregación replicativa: durante la división celular, las mitocondrias se distribuyen al azar entre las células hijas; el porcentaje de heteroplasmia puede cambiar aleatoriamente de generación en

generación, incluyendo la deriva hacia homoplasmia para el alelo normal o el mutante (Strachan & Read, 2019).

6.9.1 Enfermedades mitocondriales

Neuropatía óptica de Leber (lhon): mutaciones en genes del complejo I (m.11778G>A en *MT-ND4* en ∼70 % de casos); pérdida visual bilateral aguda en adultos jóvenes (20–30 años); predominio en varones (penetrancia mayor: ∼50 % en varones hemicigotos vs. ∼10 % en hembras homoplásmicas para la mutación) — mecanismo no completamente aclarado, posiblemente relacionado con hormonas o variantes genéticas nucleares modificadoras.

Síndrome MELAS (miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica, episodios tipo ictus): mutación en el ARNt^(Leu(UUR)) del ADNmt (m.3243A>G en >80 % de casos); episodios agudos de infarto cortical sin oclusión vascular demostrable.

Síndrome MERRF (miopatía, epilepsia, fibras rojo-rasgadas): mutación m.8344A>G en ARNt^(Lys); fibras musculares con acumulación de mitocondrias aberrantes visibles como «fibras rojo-rasgadas» (tricrómico de Gomori).

En el Laboratorio

El diagnóstico de enfermedades mitocondriales en el laboratorio de genética molecular del BQF incluye:

1. **PCR + RFLP (restriction fragment length polymorphism)**: detección rápida de mutaciones puntuales conocidas (ej.:

m.11778G>A en LHON). La mutación elimina o crea un sitio de restricción; los fragmentos resultantes se analizan en electroforesis. Permite estimar el porcentaje de heteroplasmia mediante densitometría de bandas.

2. **Pirosecuenciación**: cuantificación precisa de heteroplasmia (sensibilidad hasta ∼5 %); adecuada para seguimiento clínico del porcentaje de moléculas mutantes.

3. **Secuenciación de nueva generación (NGS) del ADNmt**: permite detectar simultáneamente variantes conocidas y desconocidas en todo el genoma mitocondrial; cuantifica heteroplasmia con alta sensibilidad (>1 %); se convierte en estándar para estudios exhaustivos. La muestra preferida es músculo esquelético (mayor porcentaje de moléculas mutantes que leucocitos en muchas enfermedades mitocondriales). 4. **Actividad de complejos respiratorios**: en tejido muscular, la medición espectrofotométrica de los complejos I–IV de la cadena respiratoria confirma disfunción energética y orienta hacia el gen causante (Strachan & Read, 2019).

6.10 Impronta genómica y disomía uniparental

La **impronta genómica** (*genomic imprinting*) es un mecanismo epigenético por el que la expresión de ciertos genes depende del progenitor del que se heredaron. Los genes improntados se expresan monoalélicamente: el alelo materno está silenciado y se expresa el paterno, o viceversa. El silenciamiento se establece mediante **metilación diferencial** del ADN en regiones de control de la impronta

(*imprinting control regions*, ICR) durante la gametogénesis y se mantiene postfertilización (Strachan & Read, 2019).

Existen aproximadamente 80–100 genes improntados en el genoma humano, distribuidos en grupos (*imprinted gene clusters*). Los mecanismos de silenciamiento incluyen metilación de los promotores (H3K4me3 →H3K9me3), y la producción de ARN largos no codificantes improntados (como *H19* y *KCNQ1OT1*) que silencian genes vecinos en *trans* (Allis & Jenuwein, 2016).

6.10.1 Síndromes de Prader-Willi y Angelman

El ejemplo más estudiado es la región 15q11-q13:

El gen *SNRPN* (y el locus *SNURF*) está activo en el cromosoma 15 *paterno* e improntado (silenciado) en el materno. El gen *UBE3A* (ubiquitin-protein ligase E3A) está activo en el cromosoma 15 *materno* e improntado en el paterno (especialmente en neuronas).

Causas de los síndromes:

Síndrome de Prader-Willi (spw): pérdida de expresión de los genes improntados *paternos* en 15q11-q13. Causas: (1) deleción del cromosoma 15 paterno (68 % de casos); (2) disomía uniparental materna de 15 (udm, 28 %); (3) defecto del centro de improntado (4 %). Fenotipo: hipotonia neonatal severa, hiperfagia progresiva desde la infancia, obesidad, hipogonadismo hipogonadotrópico, talla baja, discapacidad intelectual leve-moderada. **Síndrome de Angelman** (sas): pérdida de expresión de *UBE3A materno*. Causas: (1) deleción del cromosoma 15 materno (68 %); (2) disomía uniparental paterna de

15 (7 %); (3) mutación en UBE3A (11 %); (4) defecto del centro de improntado (3 %); (5) etiología desconocida (11 %). Fenotipo: discapacidad intelectual severa, ausencia de habla, epilepsia, facies característica, movimientos de marioneta, aparente felicidad (Nussbaum et al., 2016).

La misma deleción cromosómica en 15q11-q13 produce fenotipos completamente diferentes dependiendo de qué cromosoma (paterno o materno) está delecionado.

6.10.2 Disomía uniparental (DUP)

La **disomía uniparental** (*uniparental disomy*, dup) ocurre cuando un individuo hereda las dos copias de un par cromosómico del mismo progenitor, sin copia del otro. Mecanismo más frecuente: error de no disyunción seguido de «rescate trisómico» (eliminación del cromosoma extra, con 1/3 de probabilidad de resultar en dup). Las consecuencias clínicas dependen de si el cromosoma afectado tiene genes improntados:

dup15mat (las dos copias son maternas) →síndrome de Prader-Willi (sin expresión de los genes paternos activos). dup15pat (las dos copias son paternas) →síndrome de Angelman (sin expresión de UBE3A materno activo). dupde cromosomas sin genes improntados relevantes →generalmente asintomática. dupde un cromosoma con gen recesivo: puede convertir una heterocigosis en homocigosis para un alelo patogénico recesivo (*isodisomía*), causando una enfermedad recesiva sin historia familiar aparente (Griffiths et al., 2020).

¿Sabías que. . . ?

El síndrome de Beckwith-Wiedemann (bws) es un síndrome de sobrecrecimiento con riesgo aumentado de tumores de Wilms y hepatoblastoma. Está causado por alteraciones de la impronta en la región 11p15.5, donde el locus *IGF2* (factor de crecimiento insulínico tipo 2) es activo solo desde el cromosoma *paterno*, y *H19* y *CDKN1C* son activos solo desde el cromosoma *materno*. La ganancia de función de IGF2 (o la pérdida de CDKN1C, un gen supresor del crecimiento) produce sobrecrecimiento fetal. Aproximadamente el 20 % de los pacientes con bws tienen disomía uniparental paterna de 11p15. El contraste con el síndrome de Silver-Russell (retraso del crecimiento intrauterino, causado por pérdida de función de IGF2) ilustra cómo los genes improntados actúan en ejes antagónicos de crecimiento (Strachan & Read, 2019).

6.11 Anticipación genética y enfermedades por expansión de repeticiones

La **anticipación genética** es el fenómeno por el que una enfermedad se manifiesta a edades más tempranas y/o con mayor severidad en generaciones sucesivas. La base molecular es la **expansión de repeticiones de trinucleótidos** (str) durante la meiosis: la secuencia de repetición inestable tiende a expandirse en cada generación, alcanzando en los descendientes un número de repeticiones que supera el umbral patogénico (Turnpenny et al., 2022).

Los mecanismos de expansión durante la meiosis incluyen el deslizamiento de la ADN polimerasa en horquillas de replicación

(*slippage*) y la formación de estructuras secundarias aberrantes (horquillas de ADN) que impiden la síntesis regular. La expansión es más pronunciada en gametos masculinos para algunas enfermedades (Huntington, expansión paterna grande), mientras que en otras es mayor en meiosis femenina (X frágil, expansión materna de premutación a mutación completa).

¿Sabías que. . . ?

La premutación del gen *FMR1* (55–200 repeticiones CGG) no causa el síndrome del X frágil clásico, pero sí puede causar en mujeres portadoras el síndrome de insuficiencia ovárica prematura asociada al X frágil (fxpoi) y en varones portadores el síndrome de ataxia-temblor asociado al X frágil (fxtas). Paradójicamente, en la premutación el gen *FMR1* se *sobreexpresa* (los ribosomas leen más copias del ARNm), y el exceso de ARN con repeticiones CGG es tóxico para las neuronas. El gen *FMR1* es uno de los más solicitados en diagnóstico genético preconcepcional y es obligatorio en la evaluación de mujeres con insuficiencia ovárica prematura sin causa aparente (Turnpenny et al., 2022).

Tabla 14. Enfermedades genéticas por expansión de repeticiones de trinucleótidos.

Enfermedad	Gen	Repetición	Normal	Patogénico	Mecanismo
Huntington	HTT	CAG	<36	≥40	Poliglutamina tóxica (proteína mutante)
Síndrome X	FMR1	CGG	<55	>200	Silenciamient

frágil					o por metilación (5'-UTR)
Distrofia miotónica 1	DMPK	CTG	<37	>50	ARN tóxico secuestra spliceosoma (3'-UTR)
Ataxia de Friedreich	FXN	GAA	<33	>66	Bloqueo transcripcional (intrón 1)
Ataxia espinocerebelosa 1	ATXN 1	CAG	<39	>39	Poliglutamina (ataxina-1 mutante)
DRPLA	ATN1	CAG	<35	>48	Poliglutamina (atrofina-1 mutante)

Fuente: Strachan & Read (2019) y Griffiths et al. (2020).

Nota. Repr. = tipo de repetición; Patog. = umbral patogénico (número de repeticiones). DRPLA = atrofia dentatorrubropalidoluisiana.

Aplicación para el Bioquímico Farmacéutico

El BQF en laboratorio de genética molecular puede realizar el diagnóstico molecular de enfermedades por expansiones de trinucleótidos. Las técnicas incluyen:

PCR convencional + electroforesis capilar: amplificación de la región repetida y separación por tamaño. Detecta alelos normales y premutaciones con precisión; puede no amplificar eficientemente alelos con >200 repeticiones (alta homología).

PCR de repeticiones específica (TP-PCR/RP-PCR): técnica especializada para confirmar expansiones grandes en X frágil y otras enfermedades; usa cebadores que amplifican a través de la región repetida y detectan alelos expandidos.

Southern blot: estándar de oro para cuantificar expansiones muy grandes (>200 CGG en FMR1) y evaluar el estado de metilación. Sigue siendo obligatorio para confirmar mutaciones completas en síndrome del X frágil.

Interpretación de resultados: el BQF debe conocer los rangos de normalidad, premutación y mutación completa para cada enfermedad, y comunicar al médico la implicación del resultado en el riesgo de transmisión familiar (Richards et al., 2015).

Caso Clínico

Situación: Un varón de 12 años es referido al servicio de genética por retraso intelectual moderado, rasgos físicos característicos (macroorquidismo postpuberal, cara alargada, orejas grandes, nariz prominente) y antecedente de que su tío materno —hermano de su madre— tenía una condición similar pero más leve. La madre tiene dificultades de aprendizaje. Se sospecha síndrome del X frágil.

Árbol genealógico interpretación: La transmisión a través de la madre (portadora) y la presencia de un tío materno afectado (con cuadro más leve) es consistente con la herencia ligada al X con anticipación materna.

Preguntas para el análisis:

1. ¿Por qué el tío materno tiene la condición más leve que el sobrino? Explica en términos de premutación, mutación completa y anticipación genética.

2. ¿Qué prueba molecular confirmaría el diagnóstico? ¿Qué valores de repeticiones CGG corresponden a normalidad, premutación y mutación completa?

3. ¿Cómo se clasifica la herencia del síndrome del X frágil? ¿En qué se diferencia del patrón esperado para una enfermedad ligada al X recesiva clásica?

4. La madre del paciente tiene 70 repeticiones CGG en *FMR1*. ¿Es portadora de premutación o mutación completa? ¿Cuál es su riesgo de transmitir la mutación completa a su siguiente hijo?

Con los patrones de herencia monogénica y no clásica establecidos, el capítulo 7 completará la Unidad 2 con el estudio de las alteraciones cromosómicas: aneuploidías, poliploidías y alteraciones estructurales, y las técnicas citogenéticas que las detectan, como el cariotipo convencional y la hibridación fluorescente in situ (FISH).

6.12 Conceptos Clave

Anticipación genética Fenómeno en el que una enfermedad se manifiesta a edades más tempranas y/o con mayor severidad en generaciones sucesivas, causado por la expansión de secuencias de repetición de trinucleótidos durante la meiosis.

Disomía uniparental (DUP) Situación en que un individuo hereda las dos copias de un par cromosómico del mismo progenitor; puede causar enfermedades si el cromosoma afectado contiene genes improntados.

Dominancia negativa Tipo de mecanismo en herencia AD donde la proteína mutante interfiere con la función de la proteína normal producida por el alelo salvaje, generalmente porque ambas forman complejos multimerizados.

Efecto umbral (mitocondrial) Nivel de heteroplasmia por encima del cual la enfermedad mitocondrial se manifiesta clínicamente; varía por tejido según su demanda energética.

Ganancia de función Mecanismo de dominancia en que la proteína mutante adquiere una actividad nueva y tóxica, independiente de la función normal del gen; caracteriza enfermedades como la enfermedad de Huntington y la acondroplasia.

Haploinsuficiencia Situación en que una sola copia funcional de un gen no produce suficiente proteína para la función normal; mecanismo de muchas enfermedades AD, especialmente aquellas que involucran factores de transcripción o proteínas estructurales dosificación-dependientes.

Hemicigoto Individuo (habitualmente varón, XY) que porta una sola copia de un gen ligado al X; no puede ser heterocigoto para genes en la región no pseudoautosómica del X.

Heteroplasmia Coexistencia en una célula u organismo de dos o más tipos de ADN mitocondrial (normal y mutante); la proporción relativa determina si se alcanza el umbral fenotípico.

Impronta genómica Mecanismo epigenético que resulta en la expresión monoalélica de ciertos genes en función del progenitor de origen; mediado por metilación diferencial del ADN en regiones de control de la impronta (ICR) establecidas en la gametogénesis.

Inactivación del cromosoma X Proceso epigenético por el que uno de los dos cromosomas X en células somáticas femeninas es silenciado de forma aleatoria y permanente; mediado por el ARN largo no codificante *XIST*; produce la cromatina de Barr observable en microscopía.

Portador Individuo heterocigoto para un alelo recesivo patogénico; no expresa el fenotipo de la enfermedad pero puede transmitirlo a su descendencia.

Premutación Número intermedio de repeticiones en expansión dinámica (ej.: 55–200 CGG en *FMR1*); no causa el fenotipo clásico completo pero es inestable y puede expandirse a mutación completa en la meiosis femenina.

6.13 Actividades de Consolidación

Actividad 1. labelindent**Identificación de patrones en árboles genealógicos.** Se presentan cuatro árboles genealógicos de familias con enfermedades genéticas. Para cada uno: (a) identifica el patrón de herencia más probable; (b) determina el genotipo de los individuos

indicados; (c) calcula el riesgo de recurrencia para el próximo hijo de la pareja señalada; (d) propón la prueba molecular más adecuada para confirmación.

Actividad 2. labelindent**Tamizaje neonatal — caso de laboratorio.** Un recién nacido tiene un resultado de fenilalanina de 320 µmol L^(−)¹ (normal: <120 µmol L^(−)¹) en el tamizaje neonatal. El médico solicita confirmación al laboratorio. Elabora el protocolo de seguimiento: (a) muestra a tomar; (b) prueba confirmatoria; (c) mensaje a comunicar a los padres sobre el patrón de herencia y el riesgo para futuros hijos.

Actividad 3. labelindent**Debate: impronta genómica y epigenética.** ¿Por qué la misma deleción en la región 15q11-q13 produce dos síndromes completamente diferentes dependiendo del origen parental? ¿Qué implicación tiene esto para la interpretación de variantes genéticas en informes de secuenciación clínica? Elaboren en grupos un esquema comparativo Prader-Willi vs. Angelman, incluyendo los distintos mecanismos causales (deleción, DUP, defecto de impronta) y sus implicaciones para el consejo genético.

6.14 Preguntas de Autoevaluación

A. Selección Múltiple

1. Una madre portadora de hemofilia A (*X^(H)X^(h)*) tiene hijos con un hombre sano (*X^(H)Y*). La probabilidad de que un hijo varón esté afectado es:

(a) 25 %

(b) **50 %**

(c) 100 %

(d) 0 %

2. La herencia mitocondrial se caracteriza principalmente por:

(a) Transmisión exclusiva a través del padre

(b) Solo afecta a varones hemicigotos

(c) **Transmisión materna exclusiva; todos los hijos de una mujer afectada heredan el ADNmt mutante**

(d) Sigue el patrón de herencia autosómica dominante

3. El síndrome de Prader-Willi es causado por la pérdida de expresión de genes improntados en la región 15q11-q13 de origen:

(a) Materno

(b) **Paterno**

(c) Ambos progenitores

(d) El origen es irrelevante

4. La anticipación genética en la enfermedad de Huntington se debe a:

(a) Metilación progresiva del promotor de *HTT*

(b) Acumulación de mutaciones somáticas en *HTT*

(c) **Expansión del número de repeticiones CAG en *HTT* de generación en generación**

(d) Silenciamiento epigenético del alelo normal

5. En la herencia autosómica dominante, el mecanismo de **dominancia negativa** se caracteriza por:

(a) Insuficiencia de la proteína normal por reducción de dosis génica

(b) Adquisición de una función tóxica nueva por la proteína mutante

(c) **Interferencia activa de la proteína mutante con la función de la proteína normal, generalmente en complejos multimerizados**

(d) Reducción de la transcripción del alelo normal

B. Verdadero o Falso

1. *«En herencia ligada al X recesiva, un padre afectado transmite la enfermedad al 50 % de sus hijos varones.»*

FALSO. Un padre afectado (*X^(m)Y*) transmite su X a todas sus hijas (que serán portadoras, *X^(N)X^(m)*) y su Y a todos sus hijos varones. Ningún hijo varón hereda el X paterno, por tanto ningún hijo varón hereda la enfermedad del padre afectado en herencia ligada al X recesiva. Este es el criterio diagnóstico más útil para distinguir herencia ligada al X recesiva de herencia autosómica recesiva.

2. *«Un individuo con heteroplasmia de 30 % para una mutación mitocondrial siempre tiene manifestaciones clínicas de la enfermedad mitocondrial.»*

FALSO. El efecto umbral de la heteroplasmia mitocondrial varía según el tejido y la enfermedad específica. En muchas enfermedades mitocondriales, la heteroplasmia debe superar el 60–80 % para que el tejido afectado no pueda compensar con las mitocondrias normales. Un 30 % de heteroplasmia generalmente está por debajo del umbral clínico para la mayoría de enfermedades mitocondriales. Además, el porcentaje puede variar entre tejidos del mismo individuo (Strachan & Read, 2019).

3. *«La disomía uniparental (DUP) de un cromosoma sin genes improntados no tiene consecuencias clínicas.»*

PARCIALMENTE VERDADERO. En general, la DUP de cromosomas sin genes improntados no produce fenotipo por la DUP en sí misma. Sin embargo, si el progenitor del que se heredan las dos copias es portador de un alelo recesivo patogénico, la isodisomía puede revelar la homocigosis para ese alelo causando una enfermedad recesiva sin historia familiar previa. Por tanto, la DUP puede tener consecuencias indirectas dependiendo del estado portador del progenitor.

C. Análisis de Casos

1. Caso — Familia con distrofia muscular de Duchenne. Una mujer trae a consulta a su hijo de 7 años con debilidad muscular progresiva,

signo de Gowers positivo y creatina cinasa (CK) sérica de 15.000 UI/L (normal: <150 UI/L). El diagnóstico clínico es distrofia muscular de Duchenne (dmd). Antecedente: el hermano mayor de la madre murió a los 22 años por insuficiencia respiratoria con diagnóstico de "miopatía".

(a) ¿Cuál es el patrón de herencia más probable? Justifica con los datos del árbol genealógico.

(b) ¿Qué prueba molecular realizarías en primer lugar para confirmar la deleción en *DMD*? ¿Qué detecta la técnica MLPA (*multiplex ligationdependent probe amplification*)?

(c) La madre quiere saber si es portadora. ¿Cómo la estudiarías? ¿Qué implicación tendría ser portadora para sus próximas decisiones reproductivas?

2. Caso — Árbol genealógico con herencia mitocondrial. Se presenta un árbol genealógico con la siguiente estructura: I-1 (mujer) tiene pérdida visual bilateral, sordera y diabetes de inicio en la adultez. Sus tres hijos (II-1 varón, II-2 mujer, II-3 varón) están todos afectados con manifestaciones variables (uno tiene solo diabetes, otro tiene el síndrome completo, el tercero tiene sordera leve). La esposa de II-1 (II-4) y sus hijos (III-1, III-2) están sanos. Los hijos de II-2 (III-3,III-4) están afectados.

(a) ¿Qué patrón de herencia muestra este árbol genealógico? ¿Cómo lo distingues de la herencia autosómica?

(b) La variabilidad entre hermanos afectados (I-2 tiene síndrome completo, I-1 tiene solo diabetes) ¿con qué concepto genético de herencia mitocondrial es consistente?

(c) ¿Qué síndrome mitocondrial podría corresponder a este fenotipo (pérdida visual, sordera, diabetes)? ¿Qué prueba molecular confirmaría el diagnóstico?

6.15 Glosario

ADN mitocondrial (ADNmt) Genoma circular de 16,569 pb presente en las mitocondrias; codifica 13 proteínas de la cadena respiratoria, 22 ARNt y 2 ARNr; heredado exclusivamente por vía materna.

Consanguinidad Situación en que los progenitores de un individuo comparten ancestros comunes; aumenta el riesgo de enfermedades autosómicas recesivas al incrementar la probabilidad de que ambos progenitores sean portadores del mismo alelo patogénico.

Consejo genético Proceso de comunicación que provee a individuos o familias información sobre diagnóstico, pronóstico, transmisión y opciones reproductivas relacionadas con enfermedades genéticas; realizado por genetistas y asesorados por bioquímicos farmacéuticos.

Cromatina de Barr Cuerpo denso visible en el núcleo de células somáticas femeninas, correspondiente al cromosoma X inactivado; el número de cuerpos de Barr es siempre $n - 1$ (donde n = número de cromosomas X).

De novo Mutación que ocurre por primera vez en un individuo, sin estar presente en ninguno de los progenitores; frecuente en enfermedades AD con reducción del fitness reproductivo.

Heredabilidad Proporción de la varianza fenotípica total atribuible a diferencias genéticas entre individuos en una población; estimada mediante estudios de gemelos; no implica determinismo genético.

Homoplasmia Estado en que todas las copias del ADN mitocondrial en una célula son idénticas (todas normales o todas mutantes).

Impronta genómica Modificación epigenética heredable que determina la expresión monoalélica de ciertos genes según el progenitor de origen; establecida por metilación diferencial del ADN en las regiones de control de impronta (ICR).

Inactivación del X (hipótesis de Lyon) Silenciamiento epigenético y aleatorio de uno de los dos cromosomas X en células somáticas femeninas durante la embriogénesis temprana; mediado por el ARN largo no codificante XIST; permanente y clonal.

Penetrancia Proporción de individuos con un genotipo causante determinado que expresan el fenotipo correspondiente; se expresa como porcentaje; penetrancia del 100 % significa que todos los portadores del alelo están afectados.

Portador Individuo heterocigoto para un alelo recesivo patogénico; fenotípicamente normal pero capaz de transmitir el alelo patogénico a su descendencia.

Premutación Número intermedio de repeticiones trinucleotídicas en un gen con expansión dinámica; no causa el fenotipo clásico completo pero es inestable y puede expandirse a mutación completa en generaciones sucesivas.

6.16 Resumen

Los patrones de herencia monogénica —autosómica dominante, autosómica recesiva, ligada al X recesiva, ligada al X dominante y ligada al Y— dejan firmas reconocibles en los árboles genealógicos que permiten estimar riesgos de recurrencia y planificar el diagnóstico molecular. La herencia autosómica dominante implica un riesgo del 50 % por descendiente y opera a través de tres mecanismos moleculares distintos: haploinsuficiencia, efecto de dominancia negativa o ganancia de función tóxica. La herencia autosómica recesiva produce enfermedad en homocigotos hijos de portadores sanos, con un riesgo del 25 % por descendiente; la consanguinidad amplifica este riesgo para alelos patogénicos raros.

La herencia ligada al X recesiva afecta principalmente a varones hemicigotos: los hijos varones de un padre afectado *no* heredan la enfermedad (heredan el Y del padre), mientras que las hijas heredan el X paterno y se convierten en portadoras. La inactivación del cromosoma X (hipótesis de Lyon), mediada por el ARNlnc *XIST*, puede producir manifestaciones en portadoras si la inactivación es sesgada hacia el X normal.

Más allá de los patrones clásicos, la herencia no mendeliana añade complejidad clínica sustancial. La herencia mitocondrial es materna

exclusiva, y sus manifestaciones dependen de la heteroplasmia: el porcentaje de moléculas mutantes debe superar un umbral específico para cada tejido antes de producir disfunción energética detectable. La impronta genómica produce fenotipos radicalmente diferentes con la misma alteración genética según el origen parental del cromosoma afectado —los síndromes de PraderWilli y Angelman son el ejemplo paradigmático, donde la misma deleción de 15q11-q13 produce cuadros completamente distintos según afecte al cromosoma paterno o materno.

La disomía uniparental puede mimetizar el efecto de una deleción al poner dos copias del mismo cromosoma parental en ausencia del otro. Finalmente, la anticipación genética —causada por la expansión dinámica de repeticiones de trinucleótidos durante la meiosis— genera cuadros progresivamente más graves en generaciones sucesivas, siendo la enfermedad de Huntington y el síndrome del X frágil los ejemplos más relevantes en la práctica clínica. Para el bioquímico farmacéutico, el dominio de todos estos patrones es la base indispensable para interpretar correctamente los resultados moleculares del laboratorio de genética y contribuir con propiedad al consejo genético de las familias (Richards et al., 2015).

CAPÍTULO VII

7 CARIOTIPO, CITOGENÉTICA Y ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

El capítulo 6 catalogó los patrones de herencia de las enfermedades monogénicas. Pero existe una categoría diferente de enfermedades genéticas: aquellas causadas no por mutaciones en un gen individual, sino por anomalías en el número o la estructura de los cromosomas enteros. Estas anomalías cromosómicas —visibles al microscopio óptico con técnicas de bandeo— son la causa más frecuente de abortos espontáneos y de discapacidad intelectual, y su diagnóstico recae en el cariotipo: la fotografía organizada del complemento cromosómico de una célula.

7.1 Introducción

El cariotipo es la representación visual organizada de los cromosomas de una célula en metafase, ordenados por tamaño, posición del centrómero y patrón de bandeo. Es una de las pruebas más longevas de la medicina genética y sigue siendo el estándar de referencia para la detección de anomalías cromosómicas groseras: cambios en el número de cromosomas (aneuploidías, poliploidías) y alteraciones estructurales (deleciones, duplicaciones, inversiones, translocaciones) (Turnpenny et al., 2022).

Las alteraciones cromosómicas se producen principalmente por errores en la meiosis (no disyunción, crossing-over desigual) o, con menor frecuencia, en la mitosis temprana. Su consecuencia clínica varía

enormemente: desde incompatibilidad con la vida (causando el 50 % de los abortos del primer trimestre) hasta síndromes con supervivencia adulta (síndrome de Down, trisomía 21) o incluso estados con fenotipo casi normal (portadores de translocaciones equilibradas) (Nussbaum et al., 2016).

El laboratorio de citogenética diagnostica estas alteraciones mediante el cariotipo por bandeo G, la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y, más recientemente, los microarrays cromosómicos (array-CGH y arrays de SNP). Para el BQF, el conocimiento de estas técnicas permite participar en el proceso diagnóstico como analista, en el control de calidad y en la interpretación de resultados; el cariotipo en contextos de diagnóstico prenatal, abortos de repetición y oncohematología son las aplicaciones más frecuentes (Strachan & Read, 2019).

7.2 Objetivos de Aprendizaje

1. Definir el cariotipo humano normal y describir la nomenclatura iscn para expresar alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales.

2. Comparar mitosis y meiosis identificando los mecanismos que generan variabilidad genética y los puntos donde puede ocurrir no disyunción.

3. Clasificar las anomalías cromosómicas numéricas (aneuploidías, poliploidías) y estructurales (deleciones, duplicaciones, inversiones, translocaciones) con sus consecuencias clínicas.

4. Describir los fundamentos y aplicaciones del bandeo G, la FISH y los microarrays cromosómicos como técnicas complementarias en el diagnóstico citogenético.

5. Relacionar el cariotipo y las técnicas citogenéticas con el diagnóstico prenatal, el estudio de abortos de repetición y el diagnóstico y monitoreo de la leucemia mieloide crónica.

7.3 Preguntas de Enfoque

1. ¿Por qué la trisomía 21 puede ocurrir en hijos de mujeres jóvenes, aunque su incidencia sea mucho mayor en mujeres mayores de 35 años?

2. ¿En qué se diferencia una translocación Robertsoniana de una translocación recíproca, y cuál tiene mayor riesgo de producir descendencia con aneuploidía?

3. ¿Por qué los portadores de la translocación Philadelphia tienen leucemia mieloide crónica, si su cariotipo general es casi normal?

4. ¿Cómo puede un individuo con mosaicismo cromosómico tener síntomas más leves que otro con la misma trisomía en todas sus células?

5. ¿Qué ventajas ofrece la FISH frente al cariotipo convencional para detectar la translocación Philadelphia en células en interfase?

7.4 El cariotipo humano normal

El genoma humano diploide contiene 46 cromosomas: 44 autosomas (22 pares) y 2 cromosomas sexuales (XX en hembras, xy en varones). El **cariotipo** es la imagen organizada de estos cromosomas en metafase, dispuestos en pares homólogos ordenados por número (del 1 al 22, más los cromosomas sexuales) según el **Sistema Internacional de Nomenclatura Cromosómica Humana** (iscn), como describen Nussbaum et al. (2016).

7.4.1 Clasificación morfológica de los cromosomas

Según la posición del centrómero, los cromosomas se clasifican en:

Metacéntricos: centrómero central; brazos p y q aproximadamente iguales (cromosomas 1, 3, 16, 19, 20).

Submetacéntricos: centrómero descentrado; brazo p claramente más corto que q (ej.: cromosomas 4, 5, 6–12, 17, 18, X).

Acrocéntricos: centrómero muy próximo a un extremo; brazo p muy pequeño con satélites y regiones organizadoras del nucléolo (nor) (cromosomas 13, 14, 15, 21, 22).

Telocéntricos: centrómero en el extremo; *no existe* en el complemento humano normal (los cromosomas con centrómero terminal en humanos son artefactos o alteraciones estructurales) (Turnpenny et al., 2022).

Los brazos cromosómicos se denominan con las letras **p** (del francés *petit*, corto) y **q** (largo). Las regiones y bandas se numeran desde el

centrómero hacia los telómeros, de modo que la banda 1q21 indica: cromosoma 1, brazo largo, región 2, banda 1.

7.4.2 Técnica de bandeo G y resolución diagnóstica

El **bandeo G** (Giemsa banding) es el estándar para el cariotipo diagnóstico. Protocolo básico:

1. Las metafases se tratan con tripsina (desnaturaliza proteínas cromosómicas parcialmente).

2. Se tiñen con Giemsa: las bandas ricas en secuencias AT (heterocromatina constitutiva y facultativa) aparecen oscuras; las bandas ricas en GC (genes activos) son claras.

3. Se obtiene un patrón específico de bandas para cada cromosoma.

La **resolución del bandeo** se expresa en número de bandas por conjunto haploide (hbr): un cariotipo de resolución estándar tiene ∼400 bandas (detecta alteraciones de >5 Mb); un cariotipo de alta resolución puede alcanzar 850 bandas, detectando deleciones de ∼3 Mb. Las microdeleciones (<3 Mb), como la del síndrome de DiGeorge (22q11.2) o del síndrome de Williams (7q11.23), requieren técnicas de mayor resolución (FISH o microarrays) (Shaffer et al., 2020).

7.4.3 Nomenclatura ISCN básica

El cariotipo se describe siguiendo la notación: número total de cromosomas, coma, constitución de cromosomas sexuales. Ejemplos:

46,XX — hembra normal 46,XY — varón normal 47,XX,+21 — hembra con trisomía 21 45,X — síndrome de Turner 46,XY,del(5)(p15.3) — deleción del brazo corto del cromosoma 5 (síndrome cri du chat) 46,XY,t(9;22)(q34;q11.2) — translocación Philadelphia equilibrada en varón 47,XX,+21[16]/46,XX[4] — mosaicismo trisomía 21: 16 células trisómicas, 4 normales

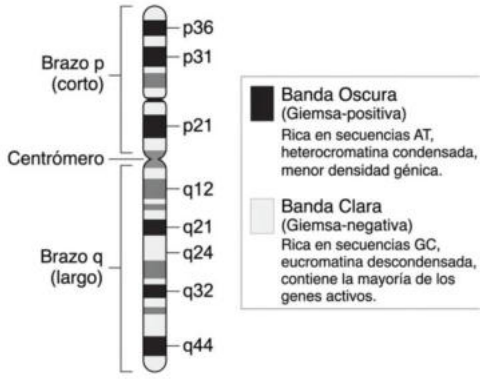


Figura 19. Esquema simplificado de bandas G en el cromosoma 1 humano.

Las bandas oscuras (Giemsa-positivas) son ricas en secuencias AT; las bandas claras (Giemsanegativas) son ricas en GC y contienen la mayoría de los genes activos. El centrómero separa los brazos p (corto) y q (largo). Elaboración propia.

7.5 Mitosis y meiosis: bases de la división celular

7.5.1 Mitosis: división celular somática

La mitosis es la división celular somática que produce dos células hijas genéticamente idénticas a la célula madre. Sus fases son:

Profase: los cromosomas se condensan (cada uno con dos cromátidas hermanas unidas por la cohesina); el huso mitótico comienza a formarse desde los centrosomas.

Prometafase: la envoltura nuclear se desintegra; los microtúbulos del huso se unen a los cinetocoros de cada cromosoma (un cinetocoro por cromátida hermana, orientados a polos opuestos).

Metafase: los cromosomas se alinean en la placa metafásica ecuatorial; el punto de control de ensamblaje del huso (*spindle assembly checkpoint*) verifica que todos los cinetocoros estén correctamente unidos antes de proceder.

Anafase: las cohesinas son degradadas por la separasa; las cromátidas hermanas se separan y migran hacia polos opuestos.

Telofase y citocinesis: se reensambla la envoltura nuclear; la célula se divide físicamente en dos por el anillo contráctil de actina-miosina (Alberts et al., 2022).

El control del ciclo celular está a cargo de las **ciclinas** y las **quinasas dependientes de ciclinas** (cdk), con puntos de control en G1/S (daño ADN →p53 →p21 → CDK4/6-ciclina D inactivo), G2/M y el punto de control intraM (huso mitótico). La proteína p53 es el «guardián del genoma»: ante daño en el ADN, detiene el ciclo o induce apoptosis (Vogelstein et al., 2013).

7.5.2 Meiosis: división especializada para gametos

La meiosis produce gametos haploides con combinaciones genéticas únicas. Se distingue de la mitosis en aspectos fundamentales:

Dos divisiones sucesivas (meiosis I y meiosis II) a partir de una sola célula diploide, produciendo cuatro células haploides. En la **meiosis I**, los cromosomas *homólogos* se separan (no las cromátidas hermanas): es la **división reductora** que reduce la ploidía de 2n a n. En la **meiosis II**, las cromátidas hermanas se separan, similares a la mitosis. El **crossing-over** (recombinación) ocurre en profase I (estadio de paquíteno): los cromosomas homólogos se alinean en bivalentes, se producen quiasmas y se intercambian segmentos entre cromátidas no hermanas, generando cromosomas recombinantes. La **orientación aleatoria** de los bivalentes en la placa de metafase I genera hasta 2^{23} = 8,388,608 combinaciones cromosómicas distintas por gameto, incluso sin crossing-over (Karp et al., 2019).

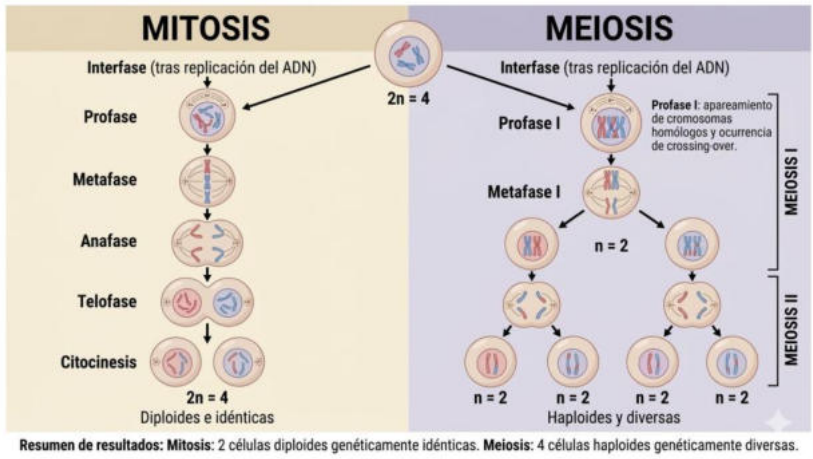


Figura 20. Comparación esquemática entre mitosis y meiosis.

La mitosis produce dos células hijas diploides idénticas a partir de una célula somática. La meiosis produce cuatro células haploides genéticamente diversas; la meiosis I es reductora (2n→n); la meiosis II es ecuacional (n→n). Elaboración propia basada en Alberts et al. (2022) y Karp et al. (2019).

7.6 Anomalías cromosómicas numéricas

Las anomalías numéricas resultan de errores en la segregación cromosómica durante la meiosis o la mitosis temprana, principalmente por **no disyunción**: ambos cromosomas homólogos (en meiosis I) o ambas cromátidas hermanas (en meiosis II o mitosis) migran al mismo polo. El resultado son gametos con un cromosoma de más (n+1) o de menos (n-1). La fertilización con un gameto normal produce un embrión trisómico (2n+1) omonosómico (2n-1) (Strachan & Read, 2019).

La **relación entre edad materna y trisomías autosómicas** es uno de los hallazgos epidemiológicos más robustos de la genética: el riesgo de trisomía 21 pasa de 1:1.400 en mujeres de 20 años a 1:30 en mujeres de 45 años. El mecanismo subyacente es el envejecimiento del complejo cohesina-condensina que mantiene unidos a los cromosomas homólogos durante el largo arresto en profase I del ovocito (que puede durar décadas). La cohesina se degrada progresivamente con el tiempo sin posibilidad de renovación, aumentando el riesgo de segregación prematura de cromosomas homólogos.

7.6.1 Aneuploidías autosómicas

Monosomía autosómica (2n-1 = 45): incompatible con la vida; casi todos los embriones monosómicos son abortados espontáneamente en el primer trimestre.

Trisomía 21 (47,XX/XY,+21, síndrome de Down): la más frecuente aneuploidía autosómica viable (incidencia: 1:700 nacimientos). Causas: no disyunción en meiosis I materna (95 %), translocación Robertsoniana der(14;21) (4 %), mosaicismo (1 %). Características: discapacidad intelectual variable, hipotonia neonatal, rasgos faciales específicos, cardiopatías congénitas en el 40–50 % de casos, riesgo aumentado de leucemia aguda (~20× la población general) y enfermedad de Alzheimer precoz (sobreexpresión de *APP* en cromosoma 21) (Turnpenny et al., 2022).

Trisomía 18 (47,+18, síndrome de Edwards): incidencia 1:6.000; grave (supervivencia media <1 año); restricción del crecimiento intrauterino, defectos cardíacos, dedos superpuestos.

Trisomía 13 (47,+13, síndrome de Patau): incidencia 1:12.000; muy grave; holoprosencefalia, polidactilia, labio y paladar hendidos, ciclopía.

7.6.2 Aneuploidías de cromosomas sexuales

Las aneuploidías de cromosomas sexuales son mejor toleradas que las autosómicas, gracias en parte a la inactivación del X:

45,X (síndrome de Turner): el único monosómico viable en humanos; incidencia 1:2.000 hembras; el 99 % de los embriones 45,X se abortan espontáneamente. Fenotipo: baja talla (gen *SHOX* en pseudoautosomal region 1 — haploinsuficiencia), gónadas rudimentarias (streak gonads), cuello alado, cúbito valgo, coartación aórtica.

47,XXY (síndrome de Klinefelter): incidencia 1:1.000 varones; fenotipo masculino; testículos pequeños, azoospermia (causa más frecuente de azoospermia no obstructiva), ginecomastia, talla alta por acción de X en huesos largos, niveles altos de FSH/LH, testosterona baja.

47,XXX: incidencia 1:1.000 hembras; generalmente fenotipo normal o con leve retraso del aprendizaje; el cromosoma X extra está inactivado; pueden tener 2 cuerpos de Barr.

47,XYY: incidencia 1:1.000 varones; talla elevada; fenotipo generalmente normal; sin malformaciones mayores. Históricamente asociado erróneamente a tendencia criminal (asociación estadística débil).

Tabla 7.1: *Aneuploidías frecuentes y sus características clínicas principales*

Síndrome	***Cariotipo***	***Incidencia***	***Características clave***
Down	*47,XX/XY,+21*	*1:700*	*DI, cardiopatías (40–50 %), riesgo leucemia, Alzheimer precoz*
Edwards	*47,XX/XY,+18*	*1:6.000*	*DI grave, cardiopatías, dedos superpuestos*
Patau	*47,XX/XY,+13*	*1:12.000*	*Holoprosencefalia, polidactilia, letal en infancia*
Turner	*45,X*	*1:2.000 F*	*Baja talla (SHOX), gónadas rudimentarias, cuello alado*
Klinefelter	*47,XXY*	*1:1.000 M*	*Azoospermia, ginecomastia, talla alta, FSH/LH elevados*
XXX	*47,XXX*	*1:1.000 F*	*Generalmente normal o leve retraso aprendizaje*

Nota. DI = Discapacidad intelectual; F = mujeres; M = varones. Elaboración propia basada en Nussbaum et al. (2016) y Turnpenny et al. (2022).

7.6.3 Poliploidías

Las **poliploidías** tienen múltiplos adicionales del complemento haploide completo:

Triploidía (3n = 69): incompatible con la vida; causa del 15–20 % de abortos del primer trimestre. Origen: fecundación dispérmica (dos espermatozoides fertilizan un óvulo) o gameto diploide. El 3nxxy (tres juegos con dos X) puede desarrollar un **mola hidatiforme parcial** con

tejido fetal. **Tetraploidía** (4n = 92): generalmente letal, aunque puede observarse como mosaicismo en tejidos (Nussbaum et al., 2016).

7.7 Anomalías cromosómicas estructurales

Las anomalías estructurales resultan de roturas cromosómicas seguidas de reunión incorrecta. Los agentes que inducen roturas incluyen radiaciones ionizantes, agentes alquilantes y errores en la reparación del ADN de doble cadena. Según si el resultado final mantiene el equilibrio del material genético (sin pérdida neta), se clasifican en **equilibradas** (portadores fenotípicamente normales) y **desequilibradas** (con pérdida o ganancia de material genético →fenotipo anormal) (Strachan & Read, 2019).

Deleción: pérdida de un segmento cromosómico. Terminal (desde un punto de rotura hasta el telómero) o intersticial (entre dos puntos de rotura). Ej.: deleción 5p (síndrome del maullido del gato, *cri du chat*): llanto agudo de tono felino por hipoplasia laríngea; deleción 22q11.2 (síndrome de DiGeorge/velocardiofacial): cardiopatía conotruncal, hipocalcemia por hipoparatiroidismo, inmunodeficiencia por hipoplasia tímica, hendidura palatina.

Duplicación: presencia de una copia adicional de un segmento. Mejor tolerada que la deleción del mismo segmento.

Inversión: un segmento cromosómico es invertido 180°. *Pericéntrica* (involucra el centrómero): puede cambiar la morfología del cromosoma y generar, al recombinar, cromosomas recombinantes con

duplicaciones y deleciones. *Paracéntrica* (no involucra el centrómero): más difícil de detectar por bandeo.

Translocación recíproca: intercambio de segmentos entre dos cromosomas no homólogos. El portador equilibrado es fenotípicamente normal; puede producir gametos desequilibrados con duplicación de un segmento y deleción del otro.

Translocación Robertsoniana: fusión de los brazos largos de dos cromosomas acrocéntricos con pérdida de los brazos cortos (que solo contienen ARNr repetitivo y son dispensables). Produce un cromosoma derivado de 45 cromosomas en total. La translocación Robertsoniana 14;21 puede producir síndrome de Down familiar cuando se forma un gameto con el cromosoma der(14;21) + un cromosoma 21 normal (Nussbaum et al., 2016).

Cromosomas en anillo: unión de los dos extremos del mismo cromosoma; habitualmente letal o fenotípicamente grave. **Isocromosoma**: cromosoma con dos brazos p (i(Xp)) o dos brazos q (i(Xq)); el isocromosoma i(Xq) es frecuente en síndrome de Turner; el i(17q) es una anomalía adquirida frecuente en ciertas leucemias.

7.7.1 La translocación Philadelphia: t(9;22) y BCR-ABL1

La **translocación Philadelphia** [t(9;22) (q34;q11.2)] es la anomalía cromosómica adquirida más conocida en oncología. El mecanismo molecular es el siguiente:

1. Una rotura de doble cadena separa el gen *ABL1* del cromosoma 9q34 del resto del cromosoma.

2. El extremo distal del 9q (que contiene *ABL1*) se transloca al cromosoma 22q11.2, donde el gen *BCR* ha sido cortado.

3. El gen de fusión *BCR-ABL1* resultante se transcribe en un ARNm de 8,5 kb que codifica la proteína de fusión p210^(BCR-ABL1) (en lmc) o p190^(BCR-ABL1) (en lla).

4. La proteína p210 es una **tirosincinasa constitutivamente activa**: fosforila sustratos de señalización que bloquean la apoptosis (*BAD*, *BCL-2*), activan la proliferación (*RAS/MAPK*, *PI3K/AKT*) y alteran la adhesión celular al estroma óseo (activación de *CRKL*) (Kumar et al., 2018).

El **imatinib** (Gleevec, Glivec) es el primer inhibidor de tirosincinasa (itk) de primera generación: se une al sitio de unión del ATP en el dominio cinasa de ABL1 cuando está en conformación inactiva, bloqueando la fosforilación. Transformó el pronóstico de la lmc de supervivencia media de 5 años a esperanza de vida casi normal. Los inhibidores de segunda (dasatinib, nilotinib) y tercera generación (ponatinib) cubren mutaciones en el dominio cinasa que causan resistencia al imatinib, incluyendo T315I (la mutación «guardiana» — *gatekeeper*).

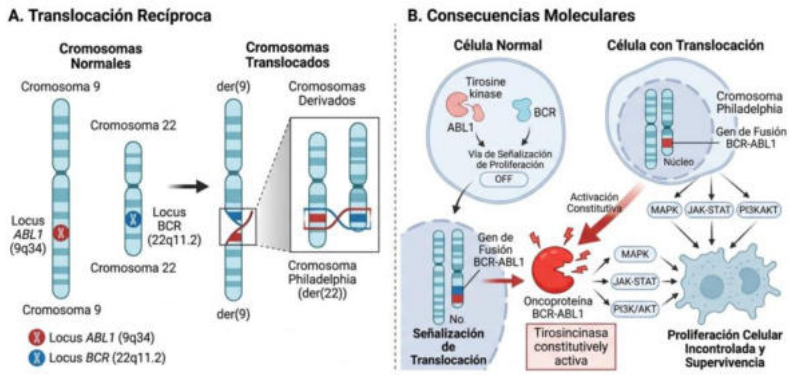


Figura 21. Mecanismo de la translocación Philadelphia t(9;22)(q34;q11.2).

El gen *ABL1* del cromosoma 9 se fusiona con *BCR* del cromosoma 22, generando el cromosoma Philadelphia (der(22)) con el gen de fusión *BCR-ABL1* que codifica una tirosincinasa constitutivamente activa. Elaboración propia basada en Kumar et al. (2018).

Concepto Clave

La translocación Philadelphia produce dos cromosomas derivados: der(9) (grande, sin fenotipo propio) y der(22)/Philadelphia (pequeño, portador de BCR-ABL1). Por eso la LMC tiene 46 cromosomas en total: el material no se pierde, solo se redistribuye. La PCR cuantitativa para el tránscrito BCR-ABL1 es más sensible que el cariotipo para el seguimiento: puede detectar 1 célula leucémica entre 100.000 células normales, permitiendo monitorizar la respuesta molecular mayor (MMR: BCR-ABL1/ABL1 < 0.1 %) y la respuesta molecular profunda (MR4.5: < 0.0032 %) (Kumar et al., 2018).

¡Importante!

Error frecuente: confundir **triploidía** (3n = 69 cromosomas — tres juegos completos de 23) con **trisomía** (2n+1 = 47 — un solo cromosoma extra). Son entidades completamente distintas: la trisomía tiene 47 cromosomas y puede ser viable (ej.: síndrome de Down), mientras que la triploidía tiene 69 cromosomas y es incompatible con la vida salvo en mosaicismo. Otro error habitual: asumir que un resultado de FISH normal descarta cualquier anomalía cromosómica. Las sondas FISH solo detectan lo que buscan específicamente; una FISH para trisomía 21 no descarta una translocación críptica no relacionada. El cariotipo completo por bandeo G sigue siendo necesario cuando la FISH es normal pero la clínica persiste.

7.8 Técnicas citogenéticas moleculares

7.8.1 FISH: hibridación fluorescente in situ

La **hibridación fluorescente *in situ*** (FISH) combina la especificidad de la hibridación de ácidos nucleicos con la visualización directa mediante microscopía de fluorescencia. Permite detectar secuencias específicas de ADN en células fijadas, tanto en metafase como en **interfase** (donde el cariotipo convencional no es aplicable) (Pinkel et al., 1986).

Tipos de sondas FISH y sus aplicaciones clínicas:

CEP (*centromere enumeration probe*): sondas para ADN satélite centromérico; detectan el número de copias de un cromosoma. Aplicación: diagnóstico rápido de aneuploidías (trisomía 21, 18, 13,

monosomía X) en células en interfase de muestra prenatal (resultado en 24–48 h vs. 2 semanas para cultivo de cariotipo).

LSI (*locus-specific identifier*): sondas para regiones génicas específicas. Aplicación: detección de t(9;22) [BCR/ABL1 dual-color, dual-fusion], deleción 22q11.2 (DiGeorge), amplificación de *HER2* (oncología de mama), deleción del cromosoma Y.

WCP (*whole chromosome paint*): mezcla de sondas que marcan todo un cromosoma con un color. Aplicación: identificar translocaciones entre cromosomas específicos cuando el bandeo G no es concluyente.

M-FISH/SKY: multicolor FISH que asigna un color diferente a cada par cromosómico. Aplicación: cariotipado completo, detección de translocaciones crípticas en oncología.

Principio de la FISH:

1. Las células se fijan en portaobjetos y se desnaturalizan (formamida 70 %, 73°C, 2 min) para separar las hebras del ADN.

2. La sonda marcada con fluorocromo (directamente fluorescente o biotinilada/digoxigeninada para detección secundaria) se desnaturaliza y se añade al portaobjetos.

3. Hibridación a 37°C durante 8–16 h; lavados stringentes para eliminar uniones inespecíficas.

4. Visualización con microscopio de fluorescencia; conteo de señales por célula (en interfase: señales = copias del locus) (Pinkel et al., 1989).

7.8.2 Microarrays cromosómicos: CGH y SNP arrays

Los **microarrays cromosómicos** representan la siguiente evolución en citogenética diagnóstica, con resolución de kilobases frente a megabases del cariotipo convencional (Shaffer et al., 2020):

aCGH (array comparative genomic hybridization): el ADN del paciente (marcado en verde) y ADN de referencia normal (marcado en rojo) se cohíbridan sobre un microarray con miles de sondas distribuidas a lo largo del genoma. Desviaciones en la ratio verde/rojo indican ganancias (verde) o pérdidas (rojo) de copias en esa región. Resolución: 50–100 kb; detecta microdeleciones y microduplicaciones

invisibles al cariotipo. **SNP array**: usa sondas para SNPs conocidos; proporciona información adicional de heterocigosidad. Puede detectar disomía uniparental (dup) sin cambios en el número de copias (algo que el aCGH no puede detectar).

Indicaciones: discapacidad intelectual inexplicable, autismo, anomalías congénitas múltiples, abortos de repetición, diagnóstico prenatal cuando el cariotipo es normal pero la ecografía muestra malformaciones.

7.8.3 Diagnóstico prenatal citogenético

Tabla 15. Comparación de métodos de diagnóstico prenatal citogenético.

Método	**Semana**	**Muestra**	**Técnica**	**Ventaja / Limitación**
NIPT (cell-free DNA)	10+	Sangre materna	NGS del ADN fetal	No invasivo; no reemplaza

			libre	cariotipo en positivos
Biopsia de vellosidades coriónicas (CVS)	10–13	Vellosidades placentarias	Cariotipo + FISH	Resultado en la semana; riesgo aborto 0,5–1 %
Amniocentesis	15–18	Líquido amniótico	Cariotipo + FISH + arrays	Estándar; riesgo aborto 0,1–0,3 %
Cordocentesis	18+	Sangre fetal (cordón)	Cariotipo directo rápido	Reservada a casos especiales; mayor riesgo

Fuente: Nussbaum et al. (2016) y Strachan & Read (2019).

Nota. NIPT = prueba prenatal no invasiva; NGS = secuenciación de nueva generación.

7.9 Mosaicismo cromosómico

El **mosaicismo cromosómico** ocurre cuando un individuo tiene dos o más líneas celulares con constituciones cromosómicas diferentes, derivadas de una mutación mitótica postcigotica (Strachan & Read, 2019):

El individuo puede tener, por ejemplo, líneas 46,XX/45,X →síndrome de Turner en mosaico, generalmente con fenotipo más leve. El síndrome de Down en mosaico (47,+21/46) puede manifestarse con discapacidad intelectual más leve e incluso fertilidad preservada. El mosaicismo gonadal (restringido a las gónadas) puede explicar recurrencia de enfermedades dominantes en familias donde los padres tienen cariotipo normal en linfocitos.

El diagnóstico del mosaicismo requiere analizar un número suficiente de metafases (generalmente 20–30) y puede requerir análisis de múltiples tejidos.

En el Laboratorio

El procesamiento de muestras para cariotipo convencional por bandeo G en el laboratorio de citogenética implica:

1. **Muestra**: sangre periférica heparinizada (linfocitos) es la más común para diagnóstico constitucional; también se utilizan amniocitos (amniocentesis), células de vellosidades coriónicas (CVS) y médula ósea (oncohematología).

2. **Cultivo**: los linfocitos se estimulan con fitohemaglutinina (pha) durante 72 horas a 37°C y 5 % CO2. Las células de médula ósea no requieren mitógeno (alta proliferación basal).

3. **Bloqueo en metafase**: se añade colchicina (o colcémida) que inhibe la polimerización de la tubulina y detiene el ciclo en metafase (huso destruido, cromosomas condensados al máximo).

4. **Tratamiento hipotónico**: solución de KCl 0.075 M hincha las células, dispersando los cromosomas.

5. **Fijación**: mezcla Carnoy (metanol:ácido acético 3:1) fija las células y elimina el citoplasma.

6. **Dispensado y bandeo**: las células se esparcen sobre portaobjetos, se dejan secar, se tratan con tripsina y se tiñen con Giemsa (bandeo G).

7. **Análisis**: un citogenetista analiza y fotografía 20–30 metafases; el cariotipo se describe en nomenclatura iscn (Strachan & Read, 2019).

El BQF puede participar en las etapas de cultivo, fijación, dispensado y control de calidad técnico del bandeo.

¿Sabías que. . . ?

Nussbaum et al. (2016) señalan que el cariotipo humano fue contado correctamente por primera vez en 1956 por Tjio y Levan, quienes determinaron que el número diploide era 46, no 48 como se creía desde 1921. El error de 48 se había perpetuado en la literatura durante 35 años porque los técnicos de microscopía ajustaban su conteo a la cifra esperada. La introducción del tratamiento hipotónico previo a la fijación fue el cambio técnico clave que permitió la dispersión correcta de los cromosomas y el conteo fiable.

Aplicación para el Bioquímico Farmacéutico

En el monitoreo de la lmc tratada con imatinib, el BQF puede participar en la determinación cuantitativa del tránscrito *BCR-ABL1* por RT-PCR cuantitativa (RTqPCR). El protocolo estándar internacional (IS — *International Scale*) normaliza los resultados para que sean comparables entre laboratorios:

1. ARN total extraído de sangre periférica (tubos PAXgene o EDTA, procesados en <24h).

2. RT-qPCR: transcripción reversa seguida de qPCR con sondas TaqMan específicas para el punto de fusión BCR-ABL1 e1a2 (p190) o b2a2/b3a2 (p210).

3. Normalización frente al gen de referencia *ABL1*; cálculo de ratio BCRABL1/ABL1 en escala IS.

4. Interpretación: respuesta hematológica completa (RHC), citogenética completa (RCC, 0 % células Ph+), respuesta molecular mayor (RMM, BCR-ABL1 IS < 0.1 %), respuesta molecular profunda (MR4.5, < 0.0032 %).

Como indican Strachan y Read (2019), la detección de valores ascendentes en un paciente previamente en RMM puede indicar resistencia temprana y requiere análisis del dominio cinasa de *ABL1* para identificar mutaciones de resistencia.

Caso Clínico

Situación: Una mujer de 38 años, embarazada de 16 semanas, solicita amniocentesis diagnóstica por edad materna avanzada. Tras el cultivo de células amnióticas y el bandeo G, el citogenetista reporta: 47,XX,+21 en 19 de 20 metafases analizadas, y 46,XX en 1 metafase.
Preguntas para el análisis:

1. ¿Qué significa el resultado 47,XX,+21? ¿Cómo se denomina este síndrome y cuál es su base cromosómica?

2. El hecho de que solo 19 de 20 metafases muestren la trisomía, ¿indica mosaicismo? ¿Qué protocolo seguiría el laboratorio para determinar si existe mosaicismo verdadero?

3. ¿Qué papel tiene la edad materna avanzada en el riesgo de trisomía 21? Explica el mecanismo relacionado con el envejecimiento del ovocito y el complejo cohesina.

4. La madre pregunta si el síndrome de Down en su bebé podría deberse a una translocación familiar heredada, y si otros miembros de la familia podrían estar en riesgo. ¿Qué estudios completarías para descartar o confirmar una translocación Robertsoniana?

Con las bases cromosómicas de la variación genética establecidas —incluyendo la estructura del cariotipo, las aneuploidías y las alteraciones estructurales—, la Unidad 3 se adentrará en los mecanismos moleculares de regulación de la expresión génica. El capítulo 8 explicará cómo las células, con el mismo genoma, pueden adoptar identidades moleculares radicalmente distintas según el contexto celular y las señales del entorno.

Conceptos Clave

Aneuploidía Condición en que el número de cromosomas no es un múltiplo exacto del número haploide; incluye monosomías (2n-1) y trisomías (2n+1); resultado de no disyunción en meiosis o mitosis.

Bandeo G Técnica de tinción cromosómica con tripsina + Giemsa que produce un patrón de bandas claras y oscuras específico de cada cromosoma; las bandas oscuras son ricas en AT; permite identificar

cada cromosoma y detectar anomalías estructurales de resolución ≥3-5 Mb.

Cariotipo Conjunto de cromosomas de una célula organizado según tamaño, posición del centrómero y patrón de bandas; analizado en metafase; descrito en nomenclatura iscn.

Crossing-over Intercambio recíproco de segmentos entre cromátidas no hermanas de cromosomas homólogos durante la profase I de la meiosis; genera variabilidad genética por recombinación.

FISH Hibridación fluorescente *in situ*; técnica que usa sondas de ácidos nucleicos marcadas con fluorocromos para visualizar loci específicos en cromosomas metafásicos o núcleos en interfase; resolución <1 Mb.

Gen de fusión BCR-ABL1 Resultado de la translocación Philadelphia t(9;22); codifica una tirosincinasa constitutivamente activa; causa leucemia mieloide crónica; diana terapéutica del imatinib y sus sucesores.

Microarray cromosómico (aCGH/SNP array) Tecnología de hibridación genómica comparativa o genotipado de SNPs sobre microarrays; resolución de kilobases; detecta microdeleciones y microduplicaciones no visibles al cariotipo convencional.

Mosaicismo Presencia de dos o más líneas celulares cromosómicamente distintas en un individuo, derivadas de una mutación postcigotica temprana; generalmente produce fenotipos más leves.

No disyunción Error de segregación cromosómica en meiosis o mitosis en que ambos cromosomas homólogos o ambas cromátidas hermanas migran al mismo polo; produce gametos o células con número anómalo de cromosomas.

Translocación Robertsoniana Fusión de los brazos largos de dos cromosomas acrocéntricos con pérdida de los brazos cortos; el portador tiene 45 cromosomas pero fenotipo normal; puede producir descendencia con trisomía efectiva.

Actividades de Consolidación

Actividad 1. Análisis de cariotipo. Se proveen imágenes de cariotipos con anomalías numéricas y estructurales. Para cada cariotipo: (a) identifica la anomalía; (b) escribe la descripción en nomenclatura iscn; (c) asocia el cariotipo con el síndrome clínico correspondiente; (d) indica si la anomalía es compatible con fertilidad o requiere diagnóstico prenatal en futuras gestaciones.

Actividad 2. Comparación mitosis/meiosis. Construyan una tabla comparativa de mitosis vs. meiosis incluyendo: número de divisiones, células hija producidas, ploidía de las células hija, variabilidad genética generada, presencia de crossing-over, tipo de células y fases donde ocurre cada proceso.

Actividad 3. Monitoreo molecular en LMC. Un paciente con lmc tiene un valor de BCR-ABL1/ABL1 (IS) = 85 % al diagnóstico. Después de 6 meses de imatinib: 0.08 %. ¿Ha alcanzado la respuesta molecular mayor (rmm)? Explica el umbral 0.1 % en escala IS, el

significado clínico del rmm y qué implicaría una re-elevación a 0.5 % a los 12 meses.

Preguntas de Autoevaluación

A. Selección Múltiple

1. El cariotipo 47,XXY corresponde al:

(a) Síndrome de Turner

(b) Síndrome de Down

(c) **Síndrome de Klinefelter**

(d) Síndrome de Edwards

2. La translocación t(9;22) produce el cromosoma Philadelphia, que:

(a) Es una translocación Robertsoniana

(b) Solo se detecta por secuenciación genómica completa

(c) Causa pérdida del gen *BCR* sin formación de gen de fusión

(d) **Genera el gen de fusión *BCR-ABL1* con actividad tirosincinasa constitutiva**

3. ¿En qué estadio de la meiosis ocurre el crossing-over?

(a) Anafase I

(b) **Profase I (estadio de paquíteno)**

(c) Metafase II (d) Profase II

4. ¿Cuál es la ventaja principal de la FISH con sondas CEP frente al cariotipo convencional en diagnóstico prenatal urgente?

(a) Mayor resolución para detectar microdeleciones de <1 Mb

(b) **Permite analizar células en interfase con resultado en 24–48 horas, sin esperar el cultivo**

(c) Proporciona información sobre variantes de secuencia génica

(d) No requiere muestra invasiva

5. El mosaicismo cromosómico resulta de:

(a) Crossing-over en meiosis I entre cromosomas no homólogos

(b) **No disyunción o pérdida cromosómica en divisiones mitóticas postcigoticas tempranas**

(c) Translocación Robertsoniana adquirida

(d) Herencia uniparental de ambos cromosomas del mismo progenitor

B. Verdadero o Falso

1. *«Los portadores de una translocación Robertsoniana entre los cromosomas 14 y 21 tienen 45 cromosomas y son fenotípicamente normales.»*

VERDADERO. La translocación Robertsoniana fusiona los brazos largos de los dos cromosomas acrocéntricos (14 y 21), con pérdida de

los brazos cortos (que solo contienen copias repetitivas de ARNr y son dispensables). El resultado es un cromosoma derivado der(14;21) y la pérdida de los dos cromosomas independientes, reduciendo el número total a 45. El portador tiene todo el material genético funcionalmente esencial y es fenotípicamente normal. Sin embargo, puede producir gametos desequilibrados y tiene un riesgo del ~10 % de descendencia con síndrome de Down (trisomía 21 por desequilibrio) (Nussbaum et al., 2016).

2. *«El cariotipo por bandeo G con resolución estándar de 400 bandas puede detectar la deleción del síndrome de DiGeorge (22q11.2, ~3 Mb).»*

FALSO. La deleción 22q11.2 tiene un tamaño típico de ~3 Mb, y la mayoría de los casos son submicroscópicos (no visibles al cariotipo estándar de 400 bandas, que detecta alteraciones de ≥5 Mb). El diagnóstico requiere FISH con sonda LSI específica para 22q11.2 o un microarray cromosómico. Este es uno de los ejemplos paradigmáticos de la limitación del cariotipo convencional y de la necesidad de técnicas de mayor resolución (Shaffer et al., 2020).

3. *«El microarray cromosómico (aCGH) puede detectar disomía uniparental (DUP) sin cambios en el número de copias.»*

FALSO para aCGH; VERDADERO para SNP array. El aCGH convencional solo detecta desbalances en el número de copias (ganancias o pérdidas). Una DUP sin cambio en el número de copias (isodisomía o heterodisomía) no produce señal en aCGH porque el número total de copias es normal. Los SNP arrays sí pueden detectar

DUP porque identifican regiones de pérdida de heterocigosidad (LOH) sin pérdida de copias, lo que es la firma de la isodisomía (Shaffer et al., 2020).

C. Análisis de Casos

1. Caso — Abortos de repetición. Una pareja con 3 abortos espontáneos del primer trimestre es remitida a genética. El cariotipo de ambos: el varón tiene 46,XY,t(11;22)(q23;q11) (translocación recíproca equilibrada); la mujer tiene 46,XX normal.

(a) El varón es portador de una translocación recíproca equilibrada: ¿tiene fenotipo anormal? Explica por qué.

(b) ¿Cómo puede esta translocación causar abortos de repetición? Describe los tipos de gametos posibles y cuáles son viables.

(c) La pareja pregunta por su riesgo de tener un hijo vivo con malformaciones. ¿Qué opciones diagnósticas existen (diagnóstico prenatal, diagnóstico preimplantacional)?

2. Caso — Diagnóstico de leucemia. Un hombre de 45 años con leucocitosis de 180.000/mm³ y esplenomegalia es referido a hematología. El frotis de sangre periférica muestra desviación a la izquierda con todos los estadios mieloides. El cariotipo de médula ósea revela 46,XY,t(9;22)(q34;q11.2) en 20/20 metafases.

(a) ¿Qué diagnóstico indica este cariotipo? ¿Qué es el cromosoma Philadelphia?

(b) Se inicia tratamiento con imatinib. A los 3 meses, el cariotipo de médulaósea muestra 46,XY en 18/20 metafases y 46,XY,t(9;22) en

2/20. ¿Cuál es el porcentaje de respuesta citogenética? ¿Se ha alcanzado la respuesta citogenética completa?

(c) El laboratorio monitorea BCR-ABL1/ABL1 por qPCR (escala IS). ¿Cuál es el umbral de la «respuesta molecular mayor» (rmm)? ¿Qué ventaja tiene el monitoreo molecular frente al cariotipo?

Glosario

Amniocentesis Procedimiento prenatal invasivo que obtiene líquido amniótico (células fetales en suspensión) para cariotipo, FISH o análisis molecular; se realiza a las 15–18 semanas; riesgo de aborto ~0.1–0.3 %.

Cinetocoro Estructura proteica multimérica ensamblada en la región centromérica de cada cromátida; conecta el cromosoma a los microtúbulos del huso mitótico y activa el punto de control del ensamblaje del huso si no está correctamente unido.

Colchicina (colcémida) Alcaloide vegetal que inhibe la polimerización de la tubulina; destruye el huso mitótico; detiene la división celular en metafase; utilizada en el procesamiento de cariotipos para acumular células en la fase óptima para el análisis.

Cromosoma Philadelphia Cromosoma 22 derivado der(22) resultante de la translocación t(9;22); porta el gen de fusión BCR-ABL1; marcador diagnóstico de la leucemia mieloide crónica.

Fitohemaglutinina (PHA) Lectina vegetal que actúa como mitógeno inespecífico de linfocitos T; estimula su proliferación en cultivo para obtener metafases para cariotipo convencional.

ISCN Sistema Internacional de Nomenclatura Cromosómica Humana; estándar internacional para describir el cariotipo y las alteraciones cromosómicas en notación simbólica.

Microarray cromosómico (aCGH) Técnica de hibridación genómica comparativa sobre chips con miles de sondas oligonucleotídicas distribuidas en el genoma; detecta ganancias y pérdidas de material genético con resolución de kilobases.

Poliploidía Condición en que el número de cromosomas es un múltiplo entero del número haploide mayor que 2n (ej.: triploidía 3n=69, tetraploidía 4n=92); incompatible con la vida en humanos en estado puro.

Sonda FISH CEP Sonda de hibridación fluorescente para ADN centromérico específico de un cromosoma; permite contar el número de copias de ese cromosoma en células en interfase en pocas horas.

Tirosincinasa Enzima que transfiere grupos fosfato del ATP a residuos tirosina de proteínas sustrato; cuando está constitutivamente activa (como en BCR-ABL1), activa permanentemente vías de señalización que promueven proliferación celular e inhiben apoptosis.

7.10 Resumen

El cariotipo humano normal comprende 46 cromosomas (23 pares) ordenados por tamaño y posición del centrómero según la nomenclatura iscn, y analizados en metafase mediante el bandeo G (Giemsa) con una resolución estándar de ~400 bandas que permite detectar alteraciones de ≥5 Mb. Los cromosomas se clasifican

morfológicamente en metacéntricos, submetacéntricos y acrocéntricos según la posición del centrómero.

La mitosis produce dos células hijas diploides idénticas controlada por ciclinas-cdk y puntos de control críticos (G1/S, G2/M, intraM). La meiosis produce cuatro células haploides genéticamente únicas mediante dos divisiones sucesivas: la división reductora (meiosis I, separa cromosomas homólogos) y la ecuacional (meiosis II, separa cromátidas hermanas); el crossing-over en profase I y la orientación aleatoria de los bivalentes son los principales generadores de diversidad genética.

Las anomalías cromosómicas numéricas resultan de la no disyunción en meiosis, con riesgo aumentado por envejecimiento de la maquinaria de cohesión del ovocito: trisomía 21 (síndrome de Down), monosomía X (Turner) y 47,XXY (Klinefelter) son las más frecuentes compatibles con supervivencia. Las anomalías estructurales —deleciones, inversiones, translocaciones— pueden ser equilibradas (portadores normales) o desequilibradas (fenotipo anormal).

La translocación Philadelphia t(9;22) es el paradigma de la citogenética oncológica: genera el gen de fusión *BCR-ABL1*, causa la leucemia mieloide crónica, y es la diana del imatinib y los inhibidores de tirosincinasa de segunda y tercera generación. Su monitoreo cuantitativo por RT-qPCR (escala IS) permite detectar respuesta molecular mayor (*BCR-ABL1*/ABL1 IS <0.1 %) y resistencia emergente. Las técnicas citogenéticas moleculares —FISH y microarrays cromosómicos— amplían el diagnóstico a resolución de

kilobases, detectando microdeleciones patogénicas invisibles al cariotipo, siendo esenciales en el diagnóstico prenatal y en la evaluación de la discapacidad intelectual de origen genético (Shaffer et al., 2020).

CAPÍTULO VIII

8 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y CONTROL MOLECULAR

Las unidades anteriores describieron el genoma, los mecanismos de transmisión de la herencia y las consecuencias de las alteraciones cromosómicas. Pero el genoma no es un texto que se lee de principio a fin en cada célula: es un texto del que se leen solo las páginas pertinentes, en el momento apropiado y en el tejido correcto. Este capítulo explora los múltiples niveles en que la expresión génica es controlada —desde la organización de la cromatina hasta la estabilidad del ARN mensajero— y cómo la desregulación de estos controles subyace a la mayoría de las enfermedades complejas.

Introducción

El genoma humano contiene ~20.000 genes codificantes de proteínas, pero ninguna célula los expresa todos simultáneamente. Un hepatocito expresa enzimas del metabolismo del glucógeno y los lípidos; un linfocito B expresa inmunoglobulinas; una célula fotorreceptora de la retina expresa opsinas. Esta identidad molecular diferencial, a pesar de que cada célula lleva el mismo genoma, es el resultado de mecanismos de regulación de la expresión génica que operan a múltiples niveles (Alberts et al., 2022).

La regulación de la expresión génica puede ocurrir en cada uno de los pasos entre el gen y la proteína funcional: en la organización de la cromatina (nivel epigenético), en el inicio y la tasa de la transcripción

(nivel transcripcional), en el procesamiento del ARNm (nivel postranscripcional), en la eficiencia de la traducción (nivel traduccional) o en la estabilidad y actividad de la proteína (nivel postraduccional) (Lewin et al., 2022). Esta regulación multinivel permite a las células responder a señales del entorno con rapidez (nivel postraduccional — segundos a minutos), con especificidad (nivel transcripcional — horas) y con durabilidad intergeneracional (nivel epigenético — persiste durante la mitosis).

Para el bioquímico farmacéutico, la regulación de la expresión génica es relevante en múltiples contextos: explica por qué una célula cancerosa sobreexpresa oncogenes, por qué los corticosteroides tienen efectos tan ubicuos (activan un factor de transcripción presente en muchos tejidos), por qué la qPCR mide la activación o represión de genes en respuesta a tratamientos farmacológicos, y qué hace que fármacos como los inhibidores de HDAC tengan propiedades anticancerosas (Harvey, 2019).

Objetivos de Aprendizaje

1. Enumerar los niveles de regulación de la expresión génica desde la cromatina hasta la proteína y justificar por qué la regulación es multinivel y jerárquica.

2. Explicar los modelos del operón lac y del operón trp en procariotas como base conceptual para los mecanismos de regulación negativa inducible y represible.

3. Describir los mecanismos de regulación transcripcional en eucariotas: promotores, enhancers, silencers, factores de transcripción y comunicación a larga distancia por bucles de cromatina.

4. Explicar los mecanismos de regulación postranscripcional: estabilidad del ARNm, splicing alternativo y el silenciamiento mediado por miARN a través del complejo RISC.

5. Relacionar la desregulación de la expresión génica con fenotipos patológicos clínicamente relevantes y las dianas farmacológicas emergentes que actúan sobre la regulación génica.

Preguntas de Enfoque

1. ¿Por qué es más eficiente para la célula regular la transcripción que regular la traducción o la estabilidad de la proteína?

2. ¿En qué se diferencia la regulación del operón lac (regulación negativa por represor) de la regulación del operón trp (represión por cofactor)? ¿Qué tienen en común conceptualmente?

3. ¿Cómo puede un enhancer a 100 kpb de distancia del promotor activar la transcripción de un gen? ¿Qué estructura cromosómica media esta comunicación?

4. ¿Por qué el silenciamiento génico por miARN se considera una capa de «ajuste fino» de la expresión génica? ¿En qué se diferencia de la regulación transcripcional?

5. Si un oncogén produce un factor de transcripción activador constitutivamente activo, ¿cómo afectaría esto a los genes diana del factor?

8.1 Niveles de regulación de la expresión génica

La expresión génica en eucariotas ocurre en un continuo que va desde el gen hasta la proteína funcional, con múltiples puntos de control. Esta organización jerárquica permite respuestas diversas y adaptativas (Alberts et al., 2022):

1. **Nivel cromatínico/epigenético**: control del acceso de la maquinaria transcripcional al ADN. Una región de cromatina condensada (heterocromatina) es inaccesible para la ARN polimerasa II; una región abierta (eucromatina) permite la transcripción. Este nivel es el más upstream y el más costoso de revertir; mediado por modificaciones de histonas, metilación del ADN, y complejos de remodelación de cromatina.

2. **Nivel transcripcional**: control de la frecuencia y duración de la transcripción; mediado por factores de transcripción que se unen a promotores, enhancers y silencers. Es el nivel con mayor impacto en el proteoma celular y el más estudiado.

3. **Nivel postranscripcional**: splicing alternativo, edición del ARN (A-to-I, C-toU), stabilidad del ARNm, y regulación por ARN no codificantes (miARN, siARN, lncARN).

4. **Nivel traduccional**: control de la eficiencia de la traducción del ARNm; mediado por factores de iniciación, secuencias UTR

(estructuras secundarias, codones uORF), y miARN que inhiben la traducción sin degradar el ARNm.

5. **Nivel postraduccional**: modificaciones covalentes de la proteína (fosforilación, ubiquitinación, glicosilación), plegamiento asistido por chaperonas, tráfico intracelular y degradación proteasómica. Cubierto en el capítulo 9.

Concepto Clave

La **expresión diferencial** — el conjunto de genes activos en cada tipo celular — es la base de la diferenciación celular y del desarrollo. Un hepatocito y una neurona tienen el mismo ADN pero perfiles de expresión génica radicalmente distintos, determinados por los factores de transcripción que cada tipo celular activa o reprime durante la diferenciación. Esta identidad transcripcional se hereda a través de las divisiones celulares sin necesidad de releer el ADN en cada ciclo (Lewin et al., 2022).

Tabla 16. Niveles jerárquicos de regulación de la expresión génica en eucariotas.

Nivel	Mecanismo principal	Molécula clave	Ejemplo
Cromatínico	Remodelación de cromatina, metilación	Histonas, DNMT	Inactivación del X
Transcripcional	Unión a promotor/enhancer	Factores de transcripción	p53, Sp1, NF-κB
Postranscripcional	Splicing alternativo,	miARN, hnRNP	SMN2 exón 7, ARE

	estabilidad ARNm		
Traduccional	Control de iniciación	eIF4E, ribosomas	IRES en ARNm viral
Postraduccional	Modificación covalente, degradación	Ubiquitina, quinasas	Ciclo celular (Ciclinas)

Fuente: Alberts et al. (2022) y Lewin et al. (2022).

Nota. Cada nivel opera de manera coordinada; la desregulación de cualquiera puede contribuir al desarrollo de cáncer u otras patologías.

8.2 Regulación en procariotas: los operones

En bacterias como *Escherichia coli*, la regulación de la expresión génica es principalmente transcripcional y opera a través del concepto de **operón**: una unidad de transcripción que incluye un promotor, un operador y varios genes estructurales relacionados funcionalmente, bajo el control de un regulador (represor o activador) (Lewin et al., 2022). Los operones son el modelo conceptual más limpio de cómo las células responden al ambiente regulando la transcripción.

8.2.1 El operón lac: regulación negativa inducible

El operón lac codifica tres enzimas necesarias para el metabolismo de la lactosa en *E. coli*: *β*-galactosidasa (*lacZ*), permeasa (*lacY*) y transacilasa (*lacA*). El locus incluye el gen regulador *lacI* (represor), el promotor (*P*) y el operador (*O*).

Dos sistemas de regulación coordinados:

1. **Regulación negativa por represor**: cuando la lactosa está ausente, el represor LacI (tetrámero) se une con alta afinidad al operador (*O1* y sitios auxiliares *O2*, *O3*), formando un bucle de ADN que impide físicamente el avance de la ARN polimerasa. Cuando la lactosa (metabolizada a alolactosa) se une al represor, este cambia de conformación y pierde afinidad por el operador, liberándolo para la transcripción.

2. **Regulación positiva por CAP-cAMP (activación catabólica)**: cuando la glucosa escasea, el adenilato ciclasa convierte ATP en AMP cíclico (ampc). El AMPc se une a la proteína CAP (*catabolite activator protein*, también llamada crp), activándola. El complejo CAP-AMPc se une a un sitio en el promotor del operón lac y aumenta la afinidad de la ARN polimerasa por el promotor, incrementando la tasa de transcripción hasta 50 veces.

La integración de ambos sistemas permite a la bacteria:

(a) no producir enzimas de lactosa cuando la lactosa no está disponible;

(b) preferir glucosa sobre lactosa cuando ambas están disponibles (represión catabólica);

(c) inducir eficientemente la utilización de lactosa cuando solo ella está disponible (Watson et al., 2014).

8.2.2 El operón trp: regulación negativa reprimible

El operón trp codifica las enzimas de la biosíntesis de triptófano (*trpE, D, C, B, A*). Su lógica es la inversa del operón lac:

Cuando el triptófano escasea: el aporepresor TrpR (sin triptófano) no puede unirse al operador; el operón está activo y produce las enzimas biosintéticas.

Cuando el triptófano es abundante: el triptófano actúa como **corepressor**, uniéndose al aporepresor TrpR y produciendo un cambio conformacional que activa su unión al operador. El represor activo bloquea la transcripción, evitando la síntesis innecesaria de enzimas cuando el triptófano ya está disponible.

Adicionalmente, el operón trp utiliza la **atenuación**: un mecanismo de regulación que produce terminación prematura de la transcripción en función de la disponibilidad del aminoácido. La secuencia líder del ARNm codifica un péptido con dos residuos de Trp consecutivos; si los ARNt de Trp están «cargados» (Trp abundante), el ribosoma avanza rápido, favoreciendo una estructura de terminación en el ARN naciente; si los ARNt están escasos, el ribosoma se detiene y no se forma la estructura de terminación, permitiendo la transcripción completa (Lewin et al., 2022).

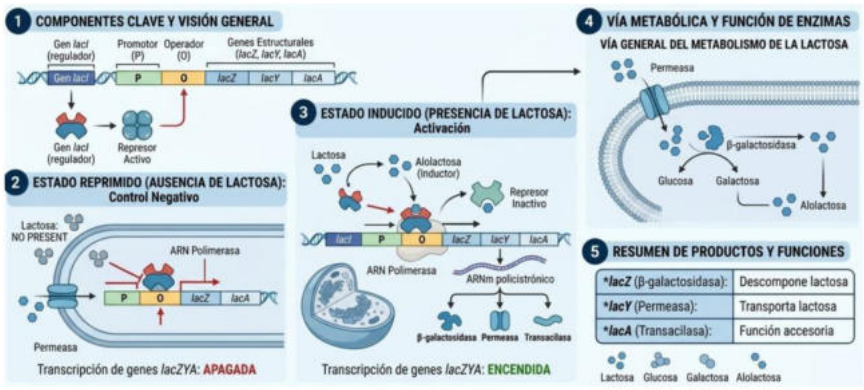


Figura 22. Modelo del operón lac de E. coli en estados reprimido e inducido.

En ausencia de lactosa (arriba), el represor activo se une al operador bloqueando la ARN polimerasa. Con lactosa (abajo), la alolactosa inactiva al represor, liberando el operador y permitiendo la transcripción de los genes estructurales. Elaboración propia basada en Watson et al. (2014) y Lewin et al. (2022).

8.3 Regulación transcripcional en eucariotas

En eucariotas, la regulación transcripcional es considerablemente más compleja que en procariotas. Los genes eucariotas no se organizan en operones; cada gen tiene su propio promotor y es regulado por una combinación única de factores de transcripción. La comunicación entre elementos reguladores y el promotor puede ocurrir a distancias de kilobases (Alberts et al., 2022).

8.3.1 Elementos reguladores en cis

Los elementos reguladores *en cis* son secuencias de ADN que controlan la transcripción del gen adyacente:

Promotor proximal: región ~200 bp aguas arriba del sitio de inicio (+1); contiene elementos como la TATA box (posición -30), la caja CAAT y la caja GC. Recluta los factores de transcripción generales (TFIIA, B, D, E, F, H) y la ARN polimerasa II para formar el Complejo de Preiniciación (cpi).

Enhancers: secuencias reguladoras que pueden estar a 100 kpb o más del promotor, en cualquier orientación y sentido, y aumentan fuertemente la transcripción al reclutar activadores transcripcionales. Los super-enhancers son agrupaciones de múltiples enhancers que controlan genes maestros de identidad celular.

Silencers: secuencias que reprimen la transcripción reclutando represores o complejos de silenciamiento de la cromatina.

Insulators (aisladores): secuencias que delimitan dominios cromosómicos (tad), impidiendo que un enhancer active genes fuera de su dominio; la proteína ctcf es el principal factor de unión a insulators en vertebrados (Lewin et al., 2022).

8.3.2 Factores de transcripción

Los factores de transcripción son proteínas con al menos dos dominios funcionales:

Dominio de unión al ADN: reconoce secuencias de 6–10 bp en enhancers o promotores. Los dominios más frecuentes son: dedos de zinc (zf, p53, GATA), cremalleras de leucina (bzip, AP-1/Fos-Jun, C/EBP), hélice-vuelta-hélice (hth, homeoproteínas Hox), y hélice-lazo-hélice (bhlh, Myc, MATH).

Dominio activador/represor: interactúa con el complejo Mediador, con el cpi, o con enzimas modificadoras de la cromatina (HAT para activación, HDAC para represión) (Strachan & Read, 2019).

Un principio fundamental es la **regulación combinatorial**: la identidad transcripcional de una célula es determinada por la *combinación* de factores de transcripción activos, no por la presencia de un único factor. La misma célula puede activar diferentes conjuntos de genes según qué combinación de factores está activa, lo que genera una enorme diversidad de programas transcripcionales a partir de un número limitado de factores.

8.3.3 Comunicación enhancer-promotor y TADs

El mecanismo molecular por el que un enhancer a larga distancia activa su promotor implica la formación de un **bucle de cromatina**: las proteínas cohesina/CTCF median la aproximación física del enhancer al promotor dentro del espacio nuclear. Estos bucles están confinados dentro de **dominios topológicamente asociantes** (tad), que son dominios cromosómicos autónomos de ∼0.1–1 Mb. Los TADs aíslan las interacciones enhancer-promotor: un enhancer solo puede activar promotores dentro del mismo TAD. Las mutaciones o deleciones en los límites de los TADs pueden poner un gen bajo el control de un enhancer incorrecto, causando enfermedad (*enhancer hijacking*), como ocurre en algunas leucemias y malformaciones del desarrollo (Alberts et al., 2022).

8.4 Regulación a nivel de cromatina

El estado de la cromatina es el primer determinante de si un gen puede ser transcrito. Dos mecanismos principales:

8.4.1 Modificaciones de histonas y código de histonas

Como se presentó en el capítulo 3, el «código de histonas» es un sistema dinámico de señalización que determina el estado de apertura o condensación de la cromatina:

H3K27ac (acetilación de H3 en Lys27): marca activa de enhancers; deposita por histona-acetiltransferasas (HAT, ej.: p300/CBP).

H3K4me3: marca activa de promotores de genes activamente transcritos; depositada por el complejo COMPASS/MLL. **H3K27me3**: marca de represión del complejo Polycomb (PRC2); silencia genes de diferenciación en células no diferenciadas.

H3K9me3: marca de heterocromatina constitutiva; reconocida por la proteína HP1 que propaga el estado de silenciamiento (Allis & Jenuwein, 2016).

El antagonismo entre los complejos Polycomb (represores, depositan H3K27me3) y Trithorax (activadores, depositan H3K4me3) determina el estado de genes del desarrollo (especialmente genes Hox) y se mantiene a través de la división celular.

8.4.2 Metilación del ADN

La metilación del ADN en citosinas de dinucleótidos CpG (por ADN metiltransferasas: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) silencia la expresión génica por dos mecanismos:

(1) bloquea directamente la unión de factores de transcripción que reconocen la secuencia no metilada;

(2) atrae proteínas de lectura de la metilación (MBD1, MeCP2) que reclutan HDAC y condensan la cromatina. Los promotores activos de genes constitutivos tienen islas CpG no metiladas; la hipermetilación aberrante de promotores de genes supresores tumorales (*CDKN2A/p16*, *BRCA1*, *MLH1*) es uno de los mecanismos epigenéticos más frecuentes de silenciamiento oncogénico (Feinberg & Vogelstein, 1983).

8.5 Regulación postranscripcional

8.5.1 Estabilidad del ARNm

La vida media del ARNm en eucariotas varía de minutos (ARNm de citocinas inflamatorias como IL-6, TNF-α) a horas o días (ARNm de proteínas estructurales). La degradación del ARNm comienza con la desadenilación (enzimas CCR4-NOT), seguida de la decapping (eliminación del cap 5') por la enzima DCP1/DCP2, y finalmente la degradación 5'→3' por Xrn1 o 3'→5' por el exosoma (Watson et al., 2014).

Las secuencias ARE (*adenylate/uridylate-rich elements*) en la 3'-UTR del ARNm reclutan proteínas que promueven su degradación rápida

(ej.: TTP/ZFP36) o su estabilización (ej.: HuR/ELAVL1). Este sistema permite una respuesta inflamatoria rápida y su apagamiento igualmente rápido: el ARNm de IL-6 tiene una vida media de ∼30 minutos en condiciones normales, pero se estabiliza durante la inflamación.

8.5.2 Biogénesis y función de los miARN

Los microARN (**miARN**) son ARN de ∼21–23 nt producidos a partir de genes propios (*MIR genes*) que pueden estar en intrones o en regiones intergénicas. El proceso de biogénesis es:

1. **Transcripción**: la ARN pol II transcribe el pri-miARN (varios kb), que forma estructuras de horquilla.

2. **Procesamiento nuclear** por el microprocessor (Drosha + DGCR8): produce el pre-miARN (∼60–70 nt, estructura de tallo-lazo).

3. **Exportación** al citoplasma por Exportina-5/RanGTP.

4. **Procesamiento citoplasmático** por Dicer (endonucleasa): produce un dúplex de ∼21–23 pb.

5. **Carga en RISC**: la hebra guía (miARN maduro) se carga en el complejo RISC (con Argonauta-2 como núcleo catalítico); la hebra pasajera se degrada.

6. **Silenciamiento del ARNm diana**: el miARN guía al RISC hacia el ARNm diana por complementariedad parcial con la 3'-UTR; el resultado es inhibición traduccional o desadenilación/degradación del ARNm (Bartel, 2004).

Un solo miARN puede regular cientos de ARNm diana (complementariedad parcial, típicamente solo la «semilla» de 7 nt del extremo 5’ del miARN debe ser perfecta). Un solo ARNm puede ser regulado por múltiples miARN. Esta red de regulación cruzada es un mecanismo de «ajuste fino» de la expresión génica con implicaciones profundas en desarrollo, diferenciación y cáncer.

Inhibición traduccional o degradación del ARNm

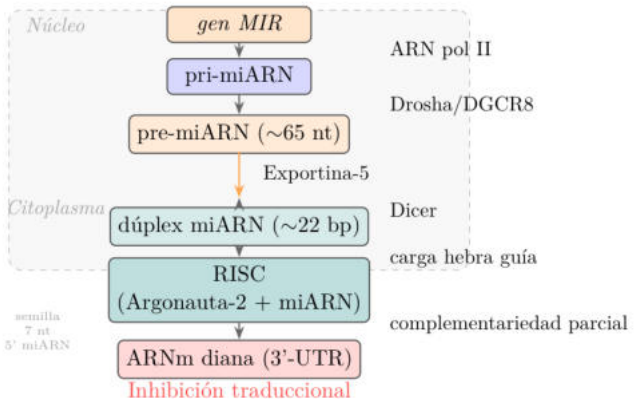


Figura 23. Biogénesis y mecanismo de acción de los microARN (miARN).

El gen MIR es transcrito a pri-miARN que es procesado en el núcleo por Drosha y en el citoplasma por Dicer, cargado en el complejo RISC y dirigido hacia la 3’-UTR del ARNm diana, produciendo silenciamiento postranscripcional. Elaboración propia basada en Bartel (2004) y Alberts et al. (2022).

8.5.3 ARN largos no codificantes — lncARN

Los **lncARN** (>200 nt, no codificantes de proteínas) son transcritos de la ARN pol II que regulan la expresión génica a múltiples niveles.

XIST (silencia el cromosoma X inactivo), *HOTAIR* (reprograma la cromatina reclutando PRC2), y *H19* (gen improntado, regula la expresión de IGF2) son ejemplos paradigmáticos. Los lncARN actúan como:

(a) guías moleculares que dirigen complejos epigenéticos a loci específicos;

(b) decoys que secuestran factores de transcripción o miARN;

(c) scaffolds que coordinan la formación de complejos proteicos (Allis & Jenuwein, 2016).

8.5.4 Splicing alternativo

El splicing alternativo permite generar múltiples isoformas de ARNm a partir de un mismo gen. Aproximadamente el 95 % de los genes humanos multiexónicos producen al menos dos isoformas. Este proceso está regulado por proteínas SR y hnRNP que reconocen elementos reguladores en el pre-ARNm; cuando falla, puede asociarse con atrofia muscular espinal, miastenia congénita y formas específicas de fibrosis quística (Lewin et al., 2022).

8.6 Señalización celular y regulación génica

Las señales extracelulares (hormonas, factores de crecimiento, citocinas, nutrientes) regulan la expresión génica principalmente a través de cascadas de señalización que terminan en la activación o represión de factores de transcripción:

8.6.1 Rutas de señalización y factores de transcripción

- **RAS/MAPK →ELK1/AP-1**: el receptor de EGF o PDGF activa RAS → RAF →MEK →ERK; ERK fosforila ELK1 en el núcleo, activando genes de proliferación (*FOS, JUN, MYC*).
- **PI3K/AKT/mTOR →FOXO/4E-BP1**: el receptor de insulina activa PI3K → AKT; AKT fosforila FOXO (inhibición →salida del núcleo) y 4E-BP1 (liberación de eIF4E, activación de traducción).
- **JAK/STAT**: las citocinas (IFN, IL-6, IL-2) activan receptores de citocinas → JAK cinasas →fosforilación de STATs →dimerización →translocación nuclear →activación de genes de respuesta inmune.
- **NF-κB**: activado por TNF-α, IL-1, LPS; normalmente retenido en el citoplasma por IκB; señales inflamatorias activan IKK →degradación de IκB →NF-κB libre transloca al núcleo →activa genes de inflamación (IL-6, IL-8, COX-2, *BCL2*) (Hall & Hall, 2020).
- **Wnt/β-catenina**: Wnt activa →estabilización de β-catenina →translocación nuclear →complejo con TCF →activación de genes proliferativos (*MYC, CCND1*). Sin Wnt, β-catenina es fosforilada por el complejo de destrucción (APC-AxinGSK3β-CK1) y degradada por el proteasoma.
- **Receptores nucleares**: glucocorticoides, estrógenos, andrógenos y vitamina D se unen a receptores intracelulares (superfamilia NR) que actúan como factores de transcripción ligando-dependientes; al unir el ligando, dimerizos se unen a

elementos de respuesta en el ADN (gre, ere, vdre) y activan la transcripción de genes diana (Hall & Hall, 2020).

Cascada RAS/MAPK

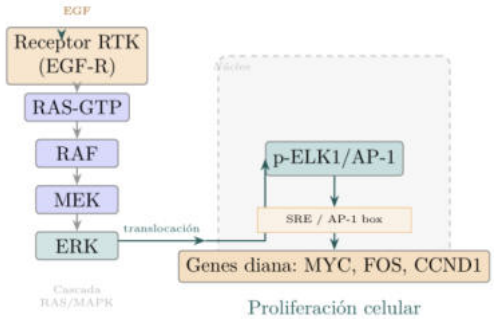


Figura 24. Ruta de señalización RAS/MAPK desde el receptor de EGF hasta la activación de genes de proliferación.

La unión del ligando activa la cascada cinasa RAS→RAF→MEK→ERK; ERK fosforilada transloca al núcleo, donde activa los factores de transcripción ELK1 y AP-1 que se unen a elementos reguladores y activan genes diana de proliferación celular. Elaboración propia basada en Alberts et al. (2022) y Hall y Hall (2020).

8.7 Terapias dirigidas a la regulación génica

El conocimiento de los mecanismos de regulación génica ha abierto nuevas clases de fármacos que actúan sobre el epigenoma y los factores de transcripción:

8.7.1 Inhibidores de HDAC

Los inhibidores de HDAC (ihdac) bloquean las desacetilasas de histonas, promoviendo la acetilación y, teóricamente, la reactivación de genes silenciados (incluyendo supresores tumorales). Cuatro fármacos están aprobados por fda para neoplasias hematológicas:

Vorinostat (SAHA): linfoma cutáneo de células T (lcct).

Romidepsin: lcct y linfoma de células T periférico (lctp).

Belinostat y **panobinostat**: linfomas y mieloma múltiple refractario.

El mecanismo no es simple: los HDAC regulan no solo histonas sino también proteínas no histonas (p53, Hsp90, α-tubulina), lo que contribuye tanto a la eficacia antitumoral como a los efectos adversos (cardiotoxicidad, trombocitopenia) (Vogelstein et al., 2013).

8.7.2 Inhibidores de DNMT (hipometilantes)

La decitabina y la azacitidina inhiben las ADN metiltransferasas (DNMT), induciendo hipometilación global e hipometilación de los promotores de genes supresores tumorales. Están aprobados para síndrome mielodisplásico y leucemia mieloide aguda, especialmente en pacientes mayores no aptos para quimioterapia intensiva. El mecanismo de acción también incluye toxicidad directa por incorporación al ADN (Feinberg & Vogelstein, 1983).

8.7.3 CRISPR-a y CRISPR-i: edición epigenómica

La tecnología CRISPR se ha adaptado para controlar la expresión génica sin cortar el ADN:

CRISPRa: una Cas9 catalíticamente muerta (dCas9) fusionada a activadores transcripcionales (vp64, vpr) es guiada por un ARNg hacia el promotor de un gen de interés, activando su transcripción. **CRISPRi**: dCas9 fusionada a represores (krab) silencia genes específicos por represión epigenética sin modificar la secuencia del ADN.

Estas herramientas de «edición epigenómica» permiten estudiar la función de genes en modelos celulares y son candidatas a terapias para reactivar genes supresores tumorales o silenciar oncogenes (Doudna & Charpentier, 2014).

¡Importante!

Error frecuente: confundir los términos **miARN** (endógeno, parcialmente complementario, regula múltiples ARNm), **siARN** (sintético o procesado de dsARN, perfectamente complementario, degrada por completo el ARNm diana) y **ARNi** (*RNA interference*, el mecanismo general que incluye ambos). Los miARN provocan principalmente inhibición traduccional cuando la complementariedad es parcial; los siARN con complementariedad perfecta provocan escisión del ARNm por Argonauta-2. Esta distinción es importante para interpretar experimentos de silenciamiento génico y para el diseño

de terapias de siARN (ej.: patisiran para amiloidosis hereditaria por TTR).

¿Sabías que. . . ?

Andrew Fire y Craig Mello recibieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2006 por el descubrimiento de la interferencia de ARN (arni) en *Caenorhabditis elegans*, publicado en 1998 en *Nature* por Fire et al. (1998). Antes de este descubrimiento, los experimentos de «silenciamiento coscúo» en plantas y el «silenciamiento postranscripcional» en *Neurospora* habían intrigado a los genetistas sin explicación molecular. El descubrimiento de que el ARN de doble cadena (arnd) es el desencadenante del silenciamiento unificó estos fenómenos y abrió una nueva era en biología molecular y terapéutica.

En el Laboratorio

La técnica **ChIP-seq** (*chromatin immunoprecipitation followed by sequencing*) permite mapear a escala genómica los sitios de unión de factores de transcripción o las marcas de histonas. El protocolo básico:

1. **Fijación**: las células se tratan con formaldehído (1 %, 10 min, 37°C) para reticular (*cross-link*) proteínas al ADN.

2. **Sonicación**: el ADN se fragmenta a tamaños de 200–500 bp.

3. **Inmunoprecipitación**: un anticuerpo específico precipita el complejo proteína-ADN de interés (ej.: anti-H3K27ac para mapear enhancers activos;

anti-p53 para sitios de unión de p53).

4. **Reversión del cross-link** y purificación del ADN.

5. **Secuenciación NGS** del ADN precipitado y mapeo al genoma de referencia.

El resultado es un «perfil de ocupancia» que muestra qué regiones del genoma están unidas por la proteína de interés en las condiciones estudiadas. El BQF puede participar en el análisis bioinformático básico (identificación de picos) y en la interpretación de los datos en el contexto de la regulación génica estudiada (Allis & Jenuwein, 2016).

Tabla 17. Inhibidores de modificadores epigenéticos aprobados clínicamente.

Fármaco	**Diana**	**Clase**	**Indicación aprobada**	**Mecanismo epig.**
Vorinostat	HDAC I/II	Hidroxamato	Linfoma cutáneo T	Hiperacetilación de histonas
Romidepsin	HDAC I	Depsipéptido	Linfoma cutáneo/periférico T	Hiperacetilación de histonas
Decitabina	DNMT1/3	Nucleósido	Sd. mielodisplásico, LMA	Hipometilación ADN
Azacitidina	DNMT1/3	Nucleósido	Sd. mielodisplásico, LMA	Hipometilación ADN + citotoxicidad
Tazemetostat	EZH2	Piridona	Linfoma folicular	Inhibición H3K27me3

Aplicación para el Bioquímico Farmacéutico

La RT-qPCR (*reverse transcription quantitative PCR*) en tiempo real es la herramienta estándar del BQF para medir la expresión génica. Sus aplicaciones clínicas incluyen:

Cuantificar la sobreexpresión de *ERBB2/HER2* en cáncer de mama (determina elegibilidad para trastuzumab). Medir *BCR-ABL1*/*ABL1* en lmc (monitoreo de respuesta molecular al imatinib). Detectar tránscritos de fusión en leucemias (*RUNX1-RUNX1T1* en LMA M2, *PML-RARA* en LMA M3).

Cuantificar la expresión de miARN circulantes como biomarcadores (miR-21 en carcinomas).

Protocolo básico: extracción de ARN total →síntesis de ADNc por retrotranscripción (oligo-dT o cebadores hexaméricos random) →qPCR con sondas TaqMan o SYBR Green →análisis ΔΔCt contra gen de referencia (*ACTB*, *GAPDH*, *RPLP0*) (Bustin et al., 2009).

Caso Clínico

Situación: En el laboratorio de oncología molecular, el BQF analiza biopsias de cáncer de mama de una paciente en tres momentos: diagnóstico inicial, después de 6 ciclos de quimioterapia, y en la recaída. Se mide la expresión de *ERBB2* por RT-qPCR y la de *miR-21* por qPCR específica. Resultados: diagnóstico (*ERBB2* sobreexpresado 8×, *miR-21* 3×); después de quimioterapia (*ERBB2* sobreexpresado 5×, *miR-21* 2×); recaída (*ERBB2* 12×, *miR-21* 7×).

Preguntas para el análisis:

1. ¿Por qué la sobreexpresión de *ERBB2* favorece la proliferación tumoral? ¿A qué ruta de señalización pertenece HER2 y qué factores de transcripción activa?

2. El miARN miR-21 tiene como diana el gen supresor de tumores *PTEN*. ¿Cómo la sobreexpresión de miR-21 contribuye a la resistencia a quimioterapia?

3. En la recaída, la sobreexpresión de *ERBB2* aumentó de 8× a 12×. ¿Qué nivel de regulación génica podría explicar este aumento? ¿Cómo estudiarías si hay amplificación del gen *ERBB2* (nivel genómico) vs. sobreactivación de su promotor (nivel transcripcional)?

La regulación de la expresión génica asegura que cada proteína se produce en la cantidad correcta, en el momento correcto y en la célula correcta. El capítulo 9 explorará qué ocurre con esa proteína una vez sintetizada: las modificaciones postraduccionales —fosforilación, ubiquitinación, glicosilación, plegamiento— y el sistema ubiquitina-proteasoma que determina el destino final de las proteínas celulares.

Conceptos Clave

Activador transcripcional Factor de transcripción que aumenta la frecuencia de la transcripción; actúa en enhancers y recluta HAT o el Mediador al promotor; su dominio de activación puede ser: ácido (VP16), glutamina-rico, o prolina-rico.

ARN de interferencia (ARNi) Mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional desencadenado por ARN de doble cadena; comprende el silenciamiento por miARN (endógeno, parcialmente complementario) y siARN (complementariedad perfecta, escisión del ARNm).

Enhancer Secuencia de ADN reguladora en cis que puede estar a gran distancia del promotor (hasta >1 Mb) y aumenta la transcripción al reclutar activadores; opera dentro de los límites del TAD.

HDAC inhibidor Fármaco que inhibe las histona desacetilasas, promoviendo la acetilación de histonas y la reactivación de genes silenciados; aprobados para neoplasias hematológicas (vorinostat, romidepsin).

miARN ARN no codificante de ~21-23 nt que regula la expresión génica postranscripcionalmente uniéndose (complementariedad parcial) a la 3'-UTR del ARNm diana a través del complejo RISC.

Operón Unidad de transcripción procariota con promotor, operador y genes estructurales relacionados funcionalmente; el operón lac es inducible (regulación negativa por represor); el trp es reprimible (represor activado por corepressor).

RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) Complejo con Argonauta-2 como núcleo; incorpora el miARN o siARN maduro y lo guía hacia el ARNm diana para mediar el silenciamiento.

TAD (*Topologically Associating Domain*) Dominio cromosómico autónomo de interacciones internas mediado por cohesina/CTCF;

delimita las interacciones funcionales entre enhancers y promotores; las mutaciones en sus límites pueden causar enfermedades del desarrollo (*enhancer hijacking*).

Actividades de Consolidación

Actividad 1. Simulación del operón lac. Usando el simulador en línea del operón lac (si disponible) o modelos de papel, simulen las cuatro condiciones: (a) glucosa alta, lactosa baja; (b) glucosa baja, lactosa baja; (c) glucosa alta, lactosa alta; (d) glucosa baja, lactosa alta. Indiquen el nivel de expresión del operón lac en cada caso y el papel de CAP-cAMP.

Actividad 2. Análisis de RT-qPCR. Datos: GAPDH (gen de referencia) Ct=20; gen diana en muestra control Ct=28; gen diana en muestra tumoral Ct=24. (a) Calcular ΔCt para cada muestra; (b) calcular ΔΔCt; (c) determinar si el gen está sobreexpresado o subexpresado en el tumor y cuántas veces; (d) discutir las limitaciones del método.

Actividad 3. Debate: inhibidores de HDAC. El vorinostat (inhibidor de HDAC) está aprobado para el linfoma cutáneo de células T. Discutan: ¿por qué inhibir las HDAC puede tener efecto antitumoral? ¿Qué efectos secundarios cabría esperar? ¿Cómo la terapia epigenética difiere conceptualmente de la quimioterapia citotóxica clásica?

8.8 Preguntas de Autoevaluación

A. Selección Múltiple

1. ¿En cuál de los siguientes niveles es más eficiente energéticamente regular la expresión génica?

(a) Degradación proteosómica de la proteína ya sintetizada

(b) Inhibición de la traducción en el ribosoma

(c) **Regulación cromatínica/transcripcional: evita producir el ARNm innecesario**

(d) Modificación postraduccional de la proteína

2. En el operón lac de *E. coli*, la alolactosa actúa como:

(a) Corepressor del aporepresor TrpR (b) Activador directo de la ARN polimerasa

(c) **Inductor: se une al represor LacI, cambia su conformación e inactiva su unión al operador**

(d) Enzima que degrada el represor LacI

3. ¿Cuál de las siguientes modificaciones de histonas se asocia con promotores activamente transcritos?

(a) H3K9me3 (heterocromatina constitutiva)

(b) H3K27me3 (silenciamiento Polycomb)

(c) **H3K4me3 (promotores de genes activos)**

(d) H3K27me1 (sin función conocida bien definida)

4. Los miARN inhiben principalmente la expresión génica a nivel:

(a) Transcripcional, bloqueando el promotor del gen

(b) Cromatínico, reclutando HDAC al locus

(c) **Postranscripcional, uniéndose a la 3'-UTR del ARNm diana a través del complejo RISC**

(d) Postraduccional, marcando la proteína con ubiquitina

5. ¿Cuál de los siguientes fármacos actúa sobre la regulación epigenética de la expresión génica?

(a) Imatinib (inhibe BCR-ABL1 tirosincinasa)

(b) Paclitaxel (inhibe despolimerización de microtúbulos)

(c) **Vorinostat (inhibe HDAC, promoviendo acetilación de histonas)**

(d) Cisplatino (forma aductos en el ADN, citotóxico)

B. Verdadero o Falso

1. *«Los operones procariotas y los genes eucariotas tienen exactamente los mismos mecanismos de regulación transcripcional.»* **FALSO.** Los operones procariotas tienen características únicas sin análogo en eucariotas:

(1) los genes son policistónicos (un ARNm codifica varias proteínas);

(2) no hay envoltura nuclear (el ribosoma puede traducir el ARNm mientras se transcribe: acoplamiento transcripción-traducción);

(3) no hay histonas (la cromatina procariota es diferente, con proteínas como HU y H-NS);

(4) los reguladores son directamente represores o activadores simples, no complejos multiméricos. En eucariotas, la regulación es enormemente más compleja con enhancers distantes, splicing alternativo, ARN no codificantes y regulación epigenética que persiste a través de la mitosis (Lewin et al., 2022).

2. *«Un gen con el promotor hipermetilado en islas CpG no puede ser reactivado porinhibidores de HDAC.»*

PARCIALMENTE VERDADERO. La hipermetilación del promotor y la desacetilación de histonas son mecanismos de silenciamiento que a menudo coexisten: las proteínas de unión al metil-ADN (MBD1, MeCP2) reclutan HDAC, generando una sinergia represora. Los inhibidores de HDAC solos son menos eficaces para revertir el silenciamiento asociado a metilación del ADN. La terapia combinada de inhibidor de DNMT (para desmetilar el promotor) con inhibidor de HDAC (para abrir la cromatina) es más efectiva para reactivar genes supresores tumorales silenciados epigenéticamente. Sin embargo, la relación no es absoluta: algunos genes metilados sí responden parcialmente a los iHDAC (Feinberg & Vogelstein, 1983).

3. *«El descubrimiento del ARNi fue reconocido con el Premio Nobel porque demostró que el ARN de doble cadena puede silenciar genes de forma secuencia-específica.»*

VERDADERO. Fire y Mello demostraron en 1998 que la inyección de ARN de doble cadena (arnd) en *C. elegans* produce silenciamiento génico con especificidad de secuencia, mucho más potente que el ARN sentido o antisentido solo. El mecanismo descubierto —que las células poseen maquinaria endógena para reconocer y destruir ARNd y ARN con estructuras de doble cadena— resultó ser universal en eucariotas y es la base de los miARN endógenos. Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2006 (Fire et al., 1998).

C. Análisis de Casos

1. Caso — Resistencia a corticosteroides. Una paciente con asma crónica grave deja de responder al tratamiento con budesonida (corticosteroide inhalado) después de 5 años. La concentración sérica de budesonida en las horas post-inhalación es adecuada. La biopsia bronquial muestra hipermetilación aberrante del promotor del gen *HDAC2* y reducción de la expresión de HDAC2.

(a) ¿Cómo actúan normalmente los glucocorticoides para reducir la inflamación bronquial a nivel molecular? Explica el rol del receptor de glucocorticoides (gr) como factor de transcripción ligando-dependiente.

(b) ¿Por qué la reducción de HDAC2 en las células bronquiales podría causar resistencia al corticosteroide? (Pista: HDAC2 es reclutada por el

GR activado para desacetilar histonas y reprimir genes de citocinas inflamatorias).

(c) ¿Qué fármaco epigenético podría intentarse como coadyuvante para restaurar la sensibilidad a los corticosteroides? Justifica en términos mecanísticos.

2. Caso — Oncogén y factor de transcripción. Un paciente con leucemia linfoblástica aguda (LLA-T) tiene una fusión oncogénica que produce un factor de transcripción anormalmente activo (notch1 truncado con dominio de activación constitutivamente activo). NOTCH1 activa normalmente genes como *MYC, HES1, CDKN1A*.

(a) ¿Cómo afectaría la activación constitutiva de NOTCH1 a la proliferación celular y la apoptosis?

(b) Si *MYC* es sobreactivado por NOTCH1 constitutivo, ¿a qué nivel de regulación génica actúa MYC? ¿Qué dominio molecular le permite activar la transcripción de genes de proliferación?

(c) Los inhibidores de gammasecretasa (que bloquean la activación de NOTCH1) son candidatos para LLA-T NOTCH1-mutado. ¿Cuál es el mecanismo de acción en términos de regulación génica?

8.9 Glosario

ARE (*adenylate/uridylate-rich elements*) Secuencias ricas en AU en la 3'-UTR del ARNm que promueven su rápida degradación al reclutar TTP/ZFP36; presentes en ARNm de citocinas y factores de crecimiento.

CAP (*catabolite activator protein* / CRP) Proteína activadora del catabolito en procariotas; activada por AMPc; estimula la transcripción del operón lac cuando la glucosa escasea.

Corepressor Molécula que activa al represor al unirse a él; en el operón trp, el triptófano actúa como corepressor del aporepresor TrpR.

Decitabina Inhibidor de DNMT; se incorpora al ADN e inhibe la metilación; produce hipometilación global; aprobado para síndrome mielodisplásico y LMA.

Expresión diferencial Diferencia cuantificable en el nivel de ARNm o proteína de un gen entre condiciones distintas (ej.: tumor vs. tejido normal); medida por RT-qPCR o ARN-seq.

Insulator / Aislador Elemento de cromatina que delimita dominios topológicos (TAD), previniendo que enhancers activen genes fuera de su dominio; la proteína CTCF es el principal factor de unión a insulators en vertebrados.

NF-κB Factor de transcripción maestro de la respuesta inflamatoria; activado por TNF-α, IL-1 y LPS; activa genes de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-8), antiapoptóticos (BCL-2, BCL-xL) y ciclinas.

SWI/SNF Complejo de remodelación de la cromatina dependiente de ATP; reposiciona o expulsa nucleosomas para abrir la cromatina; frecuentemente mutado en cánceres (ARID1A, SMARCB1).

8.10 Resumen

La regulación de la expresión génica en eucariotas opera en múltiples niveles jerárquicos: cromatínico/epigenético, transcripcional, postranscripcional, traduccional y postraduccional. Esta organización permite respuestas rápidas, específicas y durables, y es la base de la diferenciación celular: todas las células de un organismo tienen el mismo ADN, pero expresan distintos subconjuntos de genes según su identidad transcripcional, determinada por los factores de transcripción activos y el estado epigenético del genoma.

Los operones procariotas — lac y trp como modelos paradigmáticos — demostraron los principios básicos: regulación negativa por represores, inducción por inductores, represión por corepresores, y la integración de múltiples señales (represión catabólica por CAP-cAMP) en una respuesta coordinada. En eucariotas, estos principios se amplían con enhancers a larga distancia (mediados por bucles de cromatina dentro de

TADs), regulación combinatorial por factores de transcripción, y la capa epigenética de modificaciones de histonas (H3K4me3 para promotores activos, H3K27me3 para silenciamiento Polycomb) y metilación del ADN en islas CpG.

La regulación postranscripcional por miARN — a través del complejo RISC — añade un control de «ajuste fino» que opera sobre la estabilidad y traducción de cientos de ARNm diana. Un solo miARN puede regular una red completa de genes relacionados; la desregulación de miARN como miR-21 (oncomiR) es un mecanismo

oncogénico bien establecido. Las terapias epigenéticas emergentes —inhibidores de HDAC (vorinostat), inhibidores de DNMT (decitabina) e inhibidores de EZH2 (tazemetostat)— aprovechan la reversibilidad del epigenoma para restaurar patrones de expresión génica normales en células tumorales. El BQF aplica estas herramientas moleculares a través de la RT-qPCR para cuantificar la expresión génica y contribuye al monitoreo de biomarcadores de respuesta a terapias epigenéticas y dirigidas (Harvey, 2019).

CAPÍTULO IX

9 MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES Y PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS

En el capítulo 8 se estableció que la expresión génica es regulada a múltiples niveles, siendo el nivel postraduccional el más distal al genoma. Este capítulo explora las transformaciones covalentes que recibe la proteína después de su síntesis, el sistema de plegamiento asistido por chaperones moleculares, la respuesta al estrés del retículo endoplásmico y el sistema ubiquitina-proteasoma como mecanismo central de control de calidad proteica. Estas vías son diana de fármacos clínicamente aprobados y de herramientas biotecnológicas en desarrollo.

9.1 Introducción

El polipéptido recién sintetizado en el ribosoma raramente constituye la forma activa de la proteína. En la gran mayoría de los casos, debe ser cortado proteolíticamente, modificado covalentemente, plegado correctamente y dirigido hacia su localización funcional antes de poder ejercer su papel biológico. Estas modificaciones postraduccionales (mpt) representan una capa de regulación que amplifica enormemente la diversidad funcional del proteoma a partir de un genoma de ~20.000 genes codificantes en humanos (Alberts et al., 2022).

La relevancia clínica y farmacéutica de las mpt es directa y multidimensional. La fosforilación de proteínas es el mecanismo central de la señalización intracelular y el blanco molecular de los

inhibidores de tirosina-cinasas —la clase de fármacos oncológicos más exitosa del siglo XXI: imatinib (leucemia mieloide crónica), erlotinib (cáncer de pulmón), trastuzumab-DM1 (cáncer de mama). La glicosilación de proteínas determina la farmacocinética, la inmunogenicidad y la actividad efectora de los biofármacos. La ubiquitinación marca proteínas para su degradación por el proteasoma 26S, y este mecanismo es blanco del bortezomib en mieloma múltiple y de la nueva clase de moléculas PROTAC (*Proteolysis-Targeting Chimeras*) (Harvey, 2019).

El plegamiento incorrecto —y el fallo progresivo de los mecanismos de control de calidad proteica— subyace a un grupo de enfermedades denominadas **proteinopatías**:

enfermedad de Alzheimer (β-amiloide y tau), Parkinson (α-sinucleína), Huntington (huntingtina-polyQ), fibrosis quística (CFTR-F508del) y enfermedades priónicas (PrP^*(Sc)*) (Kumar et al., 2018). La comprensión molecular de estos mecanismos abre posibilidades terapéuticas que el bioquímico farmacéutico debe dominar.

9.2 Objetivos de Aprendizaje

1. Clasificar los principales tipos de mpt (fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, acetilación, metilación, sumoilación, proteólisis) describiendo mecanismo, enzimas responsables y función biológica.

2. Explicar el papel de los chaperones moleculares Hsp70 y Hsp60/GroEL en el plegamiento cotraduccional y postraduccional, y la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).

3. Describir el sistema ubiquitina-proteasoma como mecanismo de degradación selectiva, incluyendo la cascada E1-E2-E3 y la especificidad por cadenas K48 de poliubiquitina.

4. Relacionar el plegamiento incorrecto con proteinopatías (Alzheimer, Parkinson, priones, fibrosis quística) explicando el mecanismo patogénico en cada caso.

5. Aplicar el conocimiento de las mpt al diseño, producción y control de calidad de biofármacos, y a la comprensión de dianas terapéuticas como el proteasoma y las chaperonas farmacológicas.

9.3 Preguntas de Enfoque

1. ¿Por qué la fosforilación es el mecanismo de señalización más versátil? ¿Qué propiedades de los residuos Ser, Thr y Tyr permiten su función como interruptores moleculares?

2. ¿En qué se diferencia la N-glicosilación de la O-glicosilación en cuanto a localización celular, aminoácido receptor y relevancia funcional para los biofármacos?

3. ¿Cómo el sistema ubiquitina-proteasoma logra degradar proteínas específicas en lugar de degradar indiscriminadamente el proteoma celular?

4. ¿Por qué las proteínas con plegamiento incorrecto tienden a formar agregados ricos en hojas β y por qué estos agregados pueden propagar el mal plegamiento a proteínas nativas?

5. ¿Qué es un PROTAC y en qué se diferencia de un inhibidor clásico de proteína como estrategia terapéutica?

9.4 Concepto y clasificación de las modificaciones postraduccionales

Las **modificaciones postraduccionales** son cambios covalentes que ocurren en la proteína después (o durante, cotraduccional) de su síntesis en el ribosoma. Se estima que el proteoma humano contiene más de 300 tipos distintos de mpt, y que el conjunto de

todas las formas modificadas de todas las proteínas —el **proteoma modificacional**— es varios órdenes de magnitud mayor que el número de genes codificantes (Alberts et al., 2022).

Las mpt se clasifican según su reversibilidad:

Reversibles: fosforilación, acetilación, metilación, sumoilación. Son mecanismos regulatorios dinámicos, capaces de responder a señales en segundos o minutos. **Irreversibles**: proteólisis, formación definitiva de puentes disulfuro, lipoilación. Son cruciales para la maduración y activación permanente de proteínas (Lodish et al., 2021).

Concepto Clave

El **código de ubiquitina** extiende la lógica del código de histonas al proteoma completo: diferentes tipos de cadenas de poliubiquitina (K48 para degradación, K63 para reparación del ADN, M1 lineal para señalización NF-*κ*B) actúan como señales moleculares leídas por proteínas que contienen dominios de unión a ubiquitina (*ubiquitin-*

binding domains, UBD). Así, la ubiquitinación no equivale simplemente a «marcar para degradar»: es un lenguaje de señalización posicional (Alberts et al.,

2022).

9.5 Tipos principales de modificaciones postraduccionales

9.5.1 Fosforilación

La **fosforilación** es la adición reversible de un grupo fosfato ($-PO^{2}\text{^}(-)$ 4) a los residuos de serina (Ser), treonina (Thr) o tirosina (Tyr) por **proteína-cinasas** (quinasas), utilizando atp como donador de fosfato. Es revertida por **proteína-fosfatasas** (Alberts et al., 2022).

Cambio de carga: la adición del grupo fosfato introduce carga negativa, modificando las interacciones electrostáticas de la proteína y alterando su conformación activa/inactiva.

Escala del quinoma: el genoma humano codifica ∼500 proteína-cinasas (el «quinoma»), representando el 1.7 % del proteoma codificante; además, existen ∼150 fosfatasas conocidas.

Relevancia terapéutica: la FDA ha aprobado más de 60 inhibidores de cinasas hasta 2024 para distintos tipos de cáncer. Ejemplos paradigmáticos: imatinib (BCR-ABL1, c-KIT, PDGFR), erlotinib (EGFR), vemurafenib (BRAF-V600E), ibrutinib (BTK en leucemia linfocítica crónica) (Harvey, 2019).

9.5.2 Glicosilación

La **glicosilación** es la adición covalente de cadenas de carbohidratos (oligosacáridos) a la proteína. Es la mpt más frecuente en proteínas secretadas y de membrana:

N-glicosilación: el oligosacárido (14 azúcares: 2 GlcNAc + 9 Man + 3 Glc) se une al grupo amida de la Asn en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr (X≠ Pro); ocurre en el RE rugoso cotraduccional, asistida por la oligosacaril-transferasa. El «árbol» de glicano es procesado progresivamente en el Golgi.

O-glicosilación: el oligosacárido se une al grupo -OH de Ser o Thr; ocurre en el Golgi, un azúcar a la vez (Lodish et al., 2021).

Aplicación para el Bioquímico Farmacéutico

La glicosilación es el parámetro crítico de calidad en biofármacos:

La **eritropoyetina** (EPO) recombinante tiene ∼40 % de su masa en carbohidratos N-ligados; la extensión de la vida media de la darbepoetina alfa se logró añadiendo 2 sitios adicionales de N-glicosilación, aumentando la vida media de 8 a 25 horas. Los **anticuerpos monoclonales** terapéuticos (trastuzumab, bevacizumab, rituximab) presentan N-glicosilación en Asn297 de la región Fc, que determina la activación del complemento y la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (adcc).

Las diferencias de glicosilación entre un biofármaco de referencia y su biosimilar son la causa principal de variación farmacocinética; el

laboratorio de control de calidad verifica el perfil de glicanos por cromatografía de glicanos en fase normal (hilic) o espectrometría de masas.

El BQF en control de calidad de biofármacos participa en la liberación de lotes con base en el perfil de glicosilación, que debe coincidir con las especificaciones de la farmacopea (Harvey, 2019).

9.5.3 Ubiquitinación y modificadores similares a ubiquitina

La **ubiquitinación** es la unión covalente de ubiquitina (proteína de 76 aa, altamente conservada desde levaduras hasta humanos) a residuos de lisina (Lys) del sustrato, mediada por una cascada de tres enzimas (Alberts et al., 2022):

1. **E1 (*ubiquitin-activating enzyme*)**: activa la ubiquitina formando un enlace tioéster con su residuo de cisteína activo, hidrolizando ATP (2 equivalentes).

2. **E2 (*ubiquitin-conjugating enzyme*)**: acepta la ubiquitina activada de la E1 y la transfiere a la E3 o directamente al sustrato.

3. **E3 (*ubiquitin ligase*)**: cataliza la transferencia final de la ubiquitina al residuo de Lys del sustrato; determina la especificidad. El genoma humano codifica >600 E3 ligasas, lo que explica la extraordinaria especificidad del sistema.

La **poliubiquitinación** (cadenas de ≥4 ubiquitinas unidas a través del residuo K48) señaliza degradación por el proteasoma 26S. Otros tipos

de cadenas tienen funciones distintas: K63 para reparación de ADN y tráfico endosomal, M1 lineal para activación del NF-κB.

Modificadores similares a ubiquitina: el genoma eucariota codifica otras proteínas relacionadas con ubiquitina —sumo (Small Ubiquitin-like Modifier), nedd8 (neddilación), isg15— que forman conjugados mediante cascadas E1-E2-E3 paralelas, pero con efectos distintos a la degradación. La sumoilación regula la localización nuclear de factores de transcripción y la respuesta al daño del ADN; la neddilación activa las E3-ligasas tipo cullin-RING (Lodish et al., 2021).

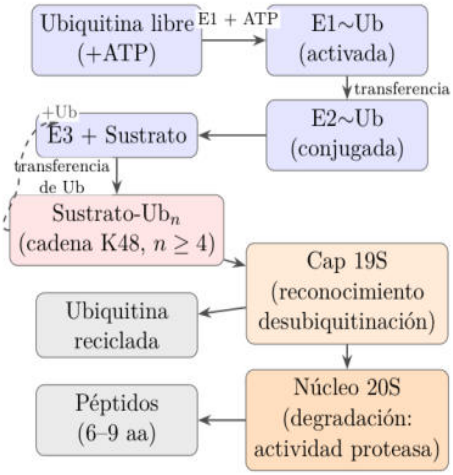


Figura 25. Cascada del sistema ubiquitina-proteasoma.

La ubiquitina es activada por E1 (consumiendo ATP), transferida a E2, y finalmente conjugada al sustrato por E3; cadenas K48 de ≥4 ubiquitinas señalizan al sustrato para degradación por el proteasoma 26S (cap 19S + núcleo 20S). Las desubiquitinasas (DUBs) reciclan la ubiquitina. Elaboración propia basada en Alberts et al. (2022) y Lodish et al. (2021).

9.5.4 Acetilación y metilación

La **acetilación N-terminal** (adición de un grupo acetilo al extremo α-amino de la proteína) ocurre cotraduccional en ∼80 % de las proteínas eucariotas, mediada por N-acetiltransferasas (NAT) asociadas al ribosoma.

La **acetilación de lisinas** (Lys) en histonas por histona-acetiltransferasas (HAT) activa la transcripción (descrito en el capítulo 3 y capítulo 8); en proteínas no histónicas, regula la actividad de enzimas metabólicas mitocondriales y la localización nuclear de factores de transcripción (Karp et al., 2019).

La **metilación** de Lys y Arg en histonas (capítulo 3) regula la compactación de la cromatina y la expresión génica. En proteínas no histónicas, la metilación puede regular la actividad, como en el caso del p53 (Alberts et al., 2022).

9.5.5 Proteólisis limitada y formación de puentes disulfuro

La **proteólisis limitada** (escisión proteolítica en sitios específicos) es una mpt irreversible que activa zimógenos: la tripsina, la quimiotripsina, los factores de la coagulación, la insulina (escisión del péptido C en el Golgi) y el colágeno son todos activados por corte proteolítico. El péptido señal del extremo N-terminal es escindido por la peptidasa señal del RE después de la translocación (Harvey, 2019).

La **formación de puentes disulfuro** (oxidación de –SH de dos cisteínas) estabiliza proteínas extracelulares (anticuerpos, insulina, factores de coagulación, albumina). En el citoplasma reductor, los

puentes disulfuro no se forman espontáneamente; la proteína disulfuro isomerasa (PDI) en el lumen del RE cataliza su formación correcta y cataliza el reordenamiento de puentes incorrectos (Lodish et al., 2021).
Tabla 9.1: *Modificaciones postraduccionales principales: mecanismo, enzimas y relevancia clínica-farmacéutica*

MPT Enzima(s) Reversible Relevancia clínica/farmacéutica

Fosforilación Cinasas / Fosfatasas Sí Inhibidores de cinasas (imatinib, erlotinib) N-glicosilación Oligosacaril-transferasa (RE) No Biofármacos, EPO, anticuerpos O-glicosilación Glucosiltransferasas (Golgi) No Mucinas, señalización Ubiquitinación K48 E1, E2, E3 ligasas No (degradación) Bortezomib, PROTACs Sumoilación E1-SUMO, E2-Ubc9, E3 Sí Resistencia a radiación en tumores Acetilación (Lys) HAT / HDAC Sí Inhibidores de HDAC (vorinostat) Metilación (Lys) HMT / KDM Sí Inhibidores EZH2 (tazemetostat) Proteólisis Proteasas específicas No Zimógenos, insulina madura

Nota. HAT = histona-acetiltransferasa; HDAC = histona-desacetilasa; HMT = histona-metiltransferasa; KDM = lisina-desmetilasa; RE = retículo endoplásmico. Elaboración propia basada en Alberts et al. (2022) y Harvey (2019).

9.6 Plegamiento de proteínas y chaperones moleculares

La información necesaria para el plegamiento correcto de una proteína está contenida en su secuencia primaria (principio de Anfinsen, demostrado con la ribonucleasa A, 1973: desnaturalización con urea +

DTT y renaturalización espontánea recuperan el 100 % de actividad). Sin embargo, en el ambiente celular — con concentración proteica

de ~300 mg mL^(−)¹ — el riesgo de agregación por interacciones hidrofóbicas aberrantes es enorme. Los **chaperones moleculares** asisten el plegamiento correcto sin formar parte de la estructura final (Alberts et al., 2022).

9.6.1 Chaperones Hsp70: ciclo de unión y liberación

Las proteínas de choque térmico de 70 kDa (**Hsp70**): BiP/GRP78 en el RE, Hsc70 en el citosol, mtHsp70 en la mitocondria, DnaK en bacterias:

Reconocen segmentos hidrofóbicos expuestos (7 residuos hidrofóbicos) en polipéptidos en síntesis o desnaturalizados. Ciclo ATP-ADP: en estado ATP, baja afinidad por el sustrato; hidrólisis a ADP aumenta la afinidad; intercambio nucleotídico (GEF: NEF, GrpE) libera ADP y recaptura ATP, liberando el sustrato. Funcionan cotraduccional (Hsc70 en colaboración con el complejo RAC/NAC en el ribosoma) y en respuesta al estrés (Lodish et al., 2021).

9.6.2 Chaperoninas Hsp60 (GroEL/GroES): plegamiento en cámara aislada

Las chaperoninas (Hsp60/GroEL en mitocondrias y bacterias; CCT/TRiC en el citosol) son complejos oligoméricos en forma de «barril doble»:

El GroEL forma un complejo de dos anillos de 7 subunidades cada uno; la proteína no plegada entra en la cavidad apical. GroES (co-chaperona) sella la cámara apical; la proteína queda encerrada en un ambiente hidrofílico que favorece el plegamiento sin competencia de otras proteínas. Ciclos de hidrólisis de ATP (7 ATP por ciclo) regulan la apertura/cierre del complejo y la liberación de la proteína (plegada o para un nuevo ciclo) (Karp et al., 2019).

9.6.3 Hsp90 y chaperonas especializadas

La **Hsp90** es una chaperona abundante que actúa sobre sustancias en estado casi plegado («near-native»), principalmente proteínas de señalización: receptores de esteroides (GR, ER, PR, AR), cinasas (HER2, CDK4, RAF) y telomerasa. La Hsp90 actúa en un ciclo que requiere co-chaperonas (Hsp70, Hop, p23, AHA1) y hidrólisis de ATP. Los inhibidores de Hsp90 (geldanamicina, ganetespib) han sido investigados como antitumorales porque desestabilizan múltiples oncoproteínas simultáneamente (Harvey, 2019).

¿Sabías que. . . ?

Karp et al. (2019) señalan que Christian Anfinsen, Cyrus Levinthal y David Eisenberg establecieron las bases del dogma de plegamiento. Paradoja de Levinthal (1969): si una proteína de 100 aa explorase aleatoriamente todas las conformaciones posibles a 10^{13} intentos/segundo, tardaría más que la edad del universo en encontrar el estado nativo. La resolución es que el plegamiento sigue «embudos de energía» (energy funnels) guiados por la secuencia primaria, no

búsqueda exhaustiva. Anfinsen recibió el Premio Nobel de Química en 1972 por su trabajo con la ribonucleasa A.

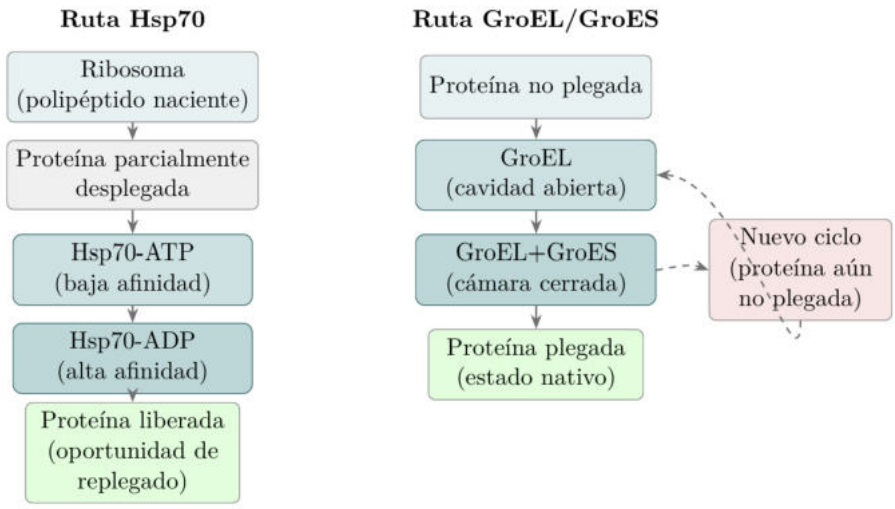


Figura 26. Rutas de asistencia al plegamiento por chaperones moleculares.

Hsp70 (izquierda) usa ciclos de hidrólisis ATP para liberar y recapturar el polipéptido, dando oportunidades sucesivas de replegamiento. GroEL/GroES (derecha) confina la proteína en una cámara hidrofílica aislada donde puede plegarse sin riesgo de agregación; proteínas no plegadas re-ingresan al ciclo. Elaboración propia basada en Alberts et al. (2022) y Karp et al. (2019).

9.7 9.4 Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) y ERAD

Cuando la carga de proteínas mal plegadas en el lumen del RE supera la capacidad de los chaperones del RE (BiP/GRP78, GRP94, PDI), se activa la **Respuesta a Proteínas Mal Plegadas** (*Unfolded Protein Response*, UPR), mediada por tres sensores transmembrana del RE (Lodish et al., 2021):

1. **IRE1**α: endorribonucleasa que escinde el ARNm de XBP1 (*unconventional splicing*), produciendo el factor de transcripción XBP1s que activa genes de expansión del RE y de degradación de proteínas.

2. **PERK**: cinasa que fosforila eIF2α, inhibiendo la traducción global pero permitiendo la traducción del factor ATF4, que activa genes de respuesta al estrés.

3. **ATF6**: factor de transcripción que en condiciones de estrés es transportado al Golgi donde es escindido por S1P/S2P, liberando el dominio citoplasmático que activa genes de biogénesis del RE.

Si el estrés persiste sin resolución, la UPR activa la apoptosis por inducción de CHOP y caspasa-12. La activación crónica de la UPR está implicada en diabetes tipo 2 (células β pancreáticas sobreestimuladas), enfermedades neurodegenerativas y cáncer.

La **Degradación Asociada al RE** (*ER-Associated Degradation*, ERAD) elimina las proteínas mal plegadas del RE: la proteína es retro-translocada al citosol por el canal Sec61/HRD1, poliubiquitinada y degradada por el proteasoma (Alberts et al., 2022). El ejemplo terapéutico más relevante es CFTR-F508del en fibrosis quística: esta proteína mutante es atrapada en el RE por ERAD antes de llegar a la membrana apical; el ivacaftor actúa como chaperona farmacológica que estabiliza el canal en la membrana.

9.8 Sistema ubiquitina-proteasoma: el proteasoma 26S

El **proteasoma 26S** es el complejo proteolítico central del citosol y el núcleo eucariota, con un peso molecular de ∼2.5 MDa. Consiste en (Lodish et al., 2021):

Núcleo catalítico 20S: cilindro de 4 anillos heptaméricos ($\alpha 7\beta 7\beta 7\alpha 7$); las subunidades β internas contienen los sitios catalíticos de actividad quimotríptica ($\beta 5$), tríptica ($\beta 2$) y caspasotríptica ($\beta 1$). El acceso al canal catalítico está restringido por los anillos α (solo proteínas desplegadas pueden entrar).

Cap regulador 19S: una base hexamérica de ATPasas (Rpt1–6) que despliegan y desubiquitinan el sustrato y lo alimentan al canal 20S, más una «tapa» de subunidades Rpn que reconocen las cadenas K48.

¡Importante!

El **bortezomib** (Velcade^(®)) es el primer inhibidor del proteasoma aprobado por la fda (2003) para mieloma múltiple (MM) y linfoma del manto. Es un dipéptido borónico que se une covalentemente y de forma reversible al sitio activo quimotríptico ($\beta 5$) del núcleo 20S. Las células del MM son especialmente sensibles porque su supervivencia depende de la activación de NF-κB (que requiere la degradación proteasomal de IκB); la inhibición del proteasoma acumula IκB (que secuestra NFκB), proteínas proapoptóticas y proteínas mal plegadas, desencadenando apoptosis preferentemente en células plasmáticas malignas (Kumar et al., 2018). El **carfilzomib** (inhibidor irreversible,

2012) y el **ixazomib** (primer inhibidor oral, 2015) son inhibidores de proteasoma de segunda generación con diferente perfil de toxicidad.

PROTACs (*Proteolysis-Targeting Chimeras*): moléculas biespecíficas que recluitan una E3-ligasa específica (ej.: CRBN, VHL) hacia un sustrato patológico de interés, induciendo su ubiquitinación y degradación. A diferencia de los inhibidores clásicos (que compiten con el ligando), los PROTACs degradan la proteína diana completamente; son catalíticos (la molécula PROTAC se recicla), actúan en concentraciones substoichiométricas y pueden silenciar proteínas «no drogables» por inhibición (Harvey, 2019).

En el Laboratorio

Técnica: Ensayo de actividad del proteasoma (fluorimetría)

Principio: Los lisados celulares o las preparaciones de proteasoma purificadas son incubados con péptidos fluorogénicos específicos de cada actividad catalítica: Suc-LLVY-AMC (quimotríptico, β5), Boc-LRR-AMC (tríptico, β2), Z-LLE-AMC (caspasotríptico, β1). La liberación del fluoróforo AMC (excitación 380 nm, emisión 460 nm) se mide en lector de fluorescencia.

Control: El ensayo se realiza en paralelo con y sin bortezomib (10 nM) para confirmar que la señal medida es específicamente de actividad del proteasoma 26S.

Aplicaciones: Control de calidad de preparaciones de proteasoma, evaluación de actividad en líneas celulares tratadas con inhibidores, investigación de biopsias tumorales. El BQF en laboratorio de

investigación oncológica o en empresas farmacéuticas puede aplicar este ensayo para el desarrollo de nuevos inhibidores del proteasoma.

9.9 Enfermedades por plegamiento incorrecto: proteinopatías

El plegamiento incorrecto de proteínas puede resultar de mutaciones en la secuencia (cambio de un residuo crítico), de condiciones de estrés celular (calor, oxidación, pH), o simplemente del envejecimiento del sistema de control de calidad. Cuando los chaperones y el proteasoma son superados, las proteínas mal plegadas se agregan en estructuras ricas en hojas β —llamadas **amiloides**— que se depositan intra o extracelularmente y son en su mayoría resistentes a la proteólisis (Kumar et al., 2018).

9.9.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por dos lesiones patognomónicas:

Placas seniles: depósitos extracelulares de péptidos Aβ40/Aβ42, derivados del procesamiento anómalo de la APP (*amyloid precursor protein*) por las secretasas β (BACE1) y γ (presenilina). El Aβ42 es más hidrofóbico y más propenso a la agregación.

Ovillos neurofibrilares: acumulación intracelular de proteína tau hiperfosforilada (por GSK3β, CDK5), que forma filamentos helicoidales apareados (PHF). Tau normalmente estabiliza los microtúbulos axonales; la hiperfosforilación impide esta función.

Ambos tipos de depósitos actúan como «semillas» (*seeds*) que nuclean más agregación: el mecanismo es análogo a la nucleación cristalina (Kumar et al., 2018).

9.9.2 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* y por la presencia de **cuerpos de Lewy**: inclusiones intracitoplasmáticas esféricas compuestas principalmente de α-sinucleína agregada. La α-sinucleína (SNCA) es una proteína de 140 aa que normalmente es intrínsecamente desordenada y regula la función vesicular en sinapsis dopaminérgicas; las mutaciones A30P, E46K, A53T, y la triplicación del gen, promueven su agregación en fibras amiloides. La α-sinucleína agregada puede propagarse intercelularmente (mecanismo prión-like), lo que explica la progresión rostro-caudal de la patología (Kumar et al., 2018).

9.9.3 Enfermedades priónicas

Los **priones** (*proteinaceous infectious particles*) son los únicos agentes infecciosos conocidos carentes de ácidos nucleicos. La proteína priónica celular PrP^*(C)* adopta una conformación con predominio de hélices α (40 % α, 3 % β); la isoforma patológica PrP^*(Sc)*

adopta una conformación con predominio de hojas β (30 % α, 43 % β). PrP^*(Sc)* actúa como «plantilla» que induce el replegamiento de PrP^*(C)* nativa en PrP^*(Sc)*, amplificándose exponencialmente. Enfermedades: enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ecj), *kuru*, insomnio

familiar fatal; enfermedad de las vacas locas (bse) en bovinos (Alberts et al., 2022).

9.9.4 Fibrosis quística: CFTR-F508del y terapia con chaperonas farmacológicas

La fibrosis quística (fq) es producida por mutaciones en el gen *CFTR* (canal de cloro activado por cAMP). La mutación más frecuente es F508del (deleción de Phe508): la proteína resultante se sintetiza normalmente pero no puede plegarse correctamente en el RE, es atrapada por BiP y degradada por ERAD antes de llegar a la membrana apical. El **lumacaftor/tezacaftor** actúan como correctores (estabilizan el plegamiento de CFTR-F508del, permitiendo que escape del RE); el **ivacaftor** actúa como potenciador (aumenta la apertura del canal en la membrana). La combinación triple **elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor** (Trikafta^(®)) ha transformado el pronóstico de la fq (Harvey, 2019).

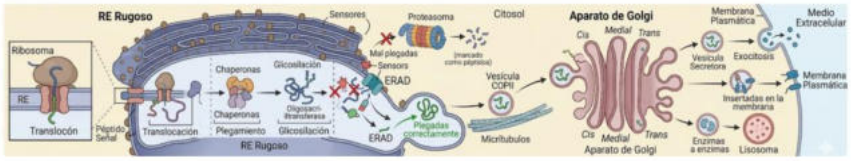


Figura 27. Tráfico intracelular de proteínas secretadas y de membrana.

Las proteínas con péptido señal se translocan al RE rugoso donde se pliegan y se N-glicosilan; las que no pasan el control de calidad son extraídas por ERAD y degradadas por el proteasoma. Las proteínas correctamente plegadas se transportan al Golgi (vesículas COPII) y de allí a sus destinos finales. Elaboración propia basada en Lodish et al. (2021) y Alberts et al. (2022).

Tabla 18. Principales proteinopatías: proteína implicada, tipo de agregado y estrategias terapéuticas.

Enfermedad	Proteína	Agregado	Localización	Terapia dirigida
Alzheimer	Aβ, tau	Placas amiloides, PHF	Extra/intracelular	Anti-Aβ (lecanemab)
Parkinson	α-sinucleína	Cuerpos de Lewy	Intracelular	Terapia génica (investigación)
Huntington	Huntingtina-polyQ	Inclusiones nucleares	Intracelular	ASO (tominersen, investigación)
Enf. priónica	PrPSc	Placas espongiformes	Extra/intracelular	Sin terapia eficaz aprobada
Fibrosis quística	CFTR-F508del	Retención en RE (ERAD)	RE (no agrega)	Trikafta (corrector + potenciador)
Amiloidosis sistémica	Transtiretina	Fibras amiloides	Extracelular	Tafamidis, patisirán (arni)

Nota. PHF = filamentos helicoidales apareados; polyQ = expansión de poliglutaminas; ERAD = degradación asociada al RE; ASO = oligonucleótido antisentido. Elaboración propia basada en Kumar et al. (2018) y Alberts et al. (2022).

Caso Clínico

Situación clínica: Paciente de 64 años con diagnóstico confirmado de mieloma múltiple (plasmocitosis >30 % en médula ósea; proteína M en electroforesis: IgG kappa 4.2 g/dL; lesiones osteolíticas en columna vertebral). Se inicia tratamiento de inducción con bortezomib + ciclofosfamida + dexametasona (vcd).

Preguntas para análisis:

1. Explica el mecanismo de acción del bortezomib en términos del sistema ubiquitina-proteasoma. ¿Por qué las células plasmáticas malignas son especialmente sensibles a la inhibición del proteasoma comparadas con células normales?

2. El seguimiento de respuesta al tratamiento se realiza midiendo la proteína M sérica. ¿Qué técnica de laboratorio se usa para su cuantificación? ¿Cómo interpreta el BQF una reducción del 90 % de la proteína M al tercer ciclo?

3. La neuropatía periférica es la toxicidad limitante de dosis del bortezomib. ¿Cómo el carfilzomib (inhibidor irreversible y selectivo del sitio quimotríptico) puede tener menor neurotoxicidad que el bortezomib? Plantea una hipótesis mecanística.

Conceptos Clave

ERAD (Degradación Asociada al RE) Mecanismo por el que las proteínas mal plegadas en el RE son retrotranslocadas al citosol,

poliubiquitinadas y degradadas por el proteasoma; evita que proteínas defectuosas lleguen a la membrana o sean secretadas.

Bortezomib Inhibidor del sitio quimotríptico (β5) del proteasoma 26S; aprobado para mieloma múltiple; induce apoptosis acumulando IκB y proteínas proapoptóticas en células plasmáticas malignas.

Chaperona molecular Proteína que asiste el plegamiento o replegamiento de otras proteínas; actúa reconociendo superficies hidrofóbicas expuestas; las principales familias son Hsp70, Hsp60 (chaperoninas) y Hsp90.

E3 ubiquitina-ligasa Enzima que determina la especificidad del sistema ubiquitinaproteasoma al catalizar la transferencia de ubiquitina a sustratos específicos; el

genoma humano codifica >600 E3 ligasas.

Glicosilación N-ligada MPT en la que un oligosacárido se une cotraduccional a la Asn en la secuencia Asn-X-Ser/Thr en el RE rugoso; determina el plegamiento, estabilidad e inmunogenicidad de las proteínas secretadas y biofármacos.

Prión Agente infeccioso proteico (PrP^*(Sc)*) sin ácidos nucleicos; la isoforma rica en hojas β convierte PrP^*(C)* nativa a su conformación patológica, causando enfermedades espongiformes transmisibles.

PROTAC Molécula biespecífica que recluta una E3-ligasa hacia una proteína diana para inducir su ubiquitinación y degradación; estrategia terapéutica para proteínas previamente «no drogables» por inhibición.

Proteasoma 26S Complejo proteolítico de ~2.5 MDa formado por el núcleo catalítico 20S y el cap regulador 19S; degrada proteínas poliubiquitinadas (K48) de manera selectiva; blanco del bortezomib.

UPR (*Unfolded Protein Response*) Respuesta adaptativa al acúmulo de proteínas mal plegadas en el RE; activada por IRE1α, PERK y ATF6; expande la capacidad del RE y activa ERAD; si fracasa, desencadena apoptosis.

9.10 Actividades de Consolidación

Actividad 1. Análisis de Western blot de ubiquitinación. Se proporciona una imagen de Western blot de lisado de células tratadas con bortezomib (0, 1, 10, 100 nM, 24h) revelado con anticuerpo anti-ubiquitina. Describe el patrón esperado de bandas (difusas, tipo smear) a concentraciones crecientes de bortezomib y justifica tu predicción con base en el mecanismo de acción del fármaco. ¿Qué proteína de referencia (loading control) usarías?

Actividad 2. Diseño de PROTAC hipotético. El oncogén *KRAS*-G12C es prácticamente «no drogable» por inhibidores clásicos excepto por sotorasib (inhibidor covalente). Diseña conceptualmente un PROTAC anti-KRAS: indica qué E3-ligasa reclutas (usa CRBN como ejemplo), qué fragmento de unión a KRAS usarías (puedes usar el farmacóforo de sotorasib) y por qué una estrategia de degradación podría ser superior a la inhibición.

Actividad 3. Caso CFTR. Un niño con fibrosis quística severa (FEV1 35 % del predicho, colonización crónica con *P. aeruginosa*) tiene

genotipo F508del/F508del. Explica: (a) por qué la proteína CFTR no llega a la membrana apical a pesar de ser sintetizada; (b) el mecanismo de acción de cada componente del Trikafta (elexacaftor, tezacaftor, ivacaftor); (c) cuál es el rol del laboratorio clínico en monitorizar la respuesta al tratamiento.

9.11 Preguntas de Autoevaluación

A. Selección Múltiple

1. ¿Cuál de las siguientes MPT es reversible y está mediada por ATP?

(a) Proteólisis

(b) **Fosforilación**

(c) Formación de puentes disulfuro

(d) N-glicosilación

2. La N-glicosilación de proteínas ocurre principalmente en:

(a) El citosol libre

(b) Los lisosomas

(c) **El retículo endoplásmico rugoso**

(d) Los peroxisomas

3. El mecanismo de acción del bortezomib en mieloma múltiple es:

(a) Inhibición de la ADN topoisomerasa II

(b) Activación del proteasoma para degradar oncoproteínas

(c) **Inhibición del sitio quimotríptico del proteasoma 26S, acumulando proteínas proapoptóticas**

(d) Bloqueo de la glicosilación de las inmunoglobulinas

4. El experimento de Anfinsen con ribonucleasa A demostró que:

(a) Las proteínas no pueden plegarse sin chaperones

(b) **La información para el plegamiento correcto está contenida en la secuencia primaria**

(c) Los puentes disulfuro son necesarios para toda función proteica

(d) Las Hsp70 son imprescindibles para el plegamiento in vitro

5. Las chaperoninas GroEL/GroES (Hsp60) se distinguen de las Hsp70 principalmente porque:

(a) Actúan cotraduccional en el ribosoma

(b) No requieren hidrólisis de ATP

(c) Son más pequeñas (<20 kDa)

(d) **Forman una cavidad cerrada donde la proteína se pliega aislada del medio citoplasmático**

B. Verdadero o Falso

1. «Las cadenas de poliubiquitina K63 señalizan degradación por el proteasoma 26S, igual que las K48.»

Falso. Las cadenas K48 señalizan degradación proteasomal; las cadenas K63 regulan reparación del ADN y tráfico endosomal. La especificidad funcional de la ubiquitinación depende del tipo de cadena (enlace entre Lys específica de ubiquitina), no solo de la presencia de la modificación.

2. «La *α*-sinucleína en la enfermedad de Parkinson puede propagarse de neurona a neurona, un mecanismo análogo al de los priones.»

Verdadero. La *α*-sinucleína agragada puede ser liberada por exocitosis y captada por neuronas vecinas, donde actúa como semilla nucleando la agregación de *α*-sinucleína nativa. Este mecanismo «prión-like» explica la progresión de la patología en el SNC.

3. «Los PROTACs son catalíticos porque la molécula PROTAC se recicla después de inducir la ubiquitinación y degradación de su proteína diana.»

Verdadero. Una vez que el complejo ternario (E3-PROTAC-sustrato) facilita la ubiquitinación del sustrato y este es liberado hacia el proteasoma, el PROTAC se disocia y puede reclutar nuevamente la E3-ligasa hacia otra molécula del sustrato. Esto permite actividad en concentraciones substoichiométricas respecto al sustrato.

C. Análisis de Casos

1. Una paciente con leucemia mieloide crónica (lmc) en fase crónica con respuesta molecular mayor (BCR-ABL1 IS <0.1 %) desarrolla resistencia a imatinib después de 18 meses. La secuenciación del dominio cinasa de BCR-ABL1 revela la mutación T315I. ¿Cómo la mutación T315I confiere resistencia al imatinib (pista: ¿qué hace el residuo Thr315 en el bolsillo de unión del fármaco)? ¿Qué estrategia terapéutica aplicarías: (a) dasatinib, (b) nilotinib, (c) ponatinib, (d) asciminib? Justifica tu elección con base en el mecanismo molecular.

2. En un laboratorio de control de calidad de biofármacos se analiza un lote de rituximab (anticuerpo monoclonal anti-CD20). El perfil de glicanos del Fc muestra un porcentaje inusualmente alto de formas afucosiladas. ¿Qué consecuencias funcionales tendría esta alteración en la glicosilación sobre la actividad del anticuerpo? ¿Qué técnica utilizaría el BQF para determinar el perfil de glicosilación? ¿Liberaría o retendría el lote?

9.12 Glosario

ADCC (Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo) Mecanismo por el que células NK o macrófagos destruyen células opsonizadas con IgG a través del receptor FcγRIII; depende de la glicosilación del Fc en Asn297; crítico para la eficacia de anticuerpos antitumorales como rituximab y trastuzumab.

BiP/GRP78 Chaperona Hsp70 del lumen del RE; detecta proteínas mal plegadas y activa los sensores de la UPR (IRE1α, PERK, ATF6); es el «guardián» del control de calidad en el RE.

Chaperona farmacológica Pequeña molécula que estabiliza conformacionalmente una proteína mutante con plegamiento deficiente; ejemplo: ivacaftor para CFTRF508del en fibrosis quística; estrategia terapéutica emergente para proteinopatías.

Cuerpos de Lewy Inclusiones intracitoplasmáticas esféricas en neuronas dopaminérgicas, compuestas principalmente de α-sinucleína polimerizada; marcadores anatomopatológicos de la enfermedad de Parkinson y de la demencia con cuerpos de Lewy.

ERAD Degradación Asociada al RE; mecanismo de control de calidad que retrotransloca al citosol las proteínas mal plegadas del RE para su degradación proteasomal; defectuoso en fibrosis quística (CFTR-F508del).

Quinoma Conjunto de los ∼500 genes que codifican proteína-cinasas en el genoma humano; representa el 1.7 % del proteoma codificante; blanco farmacológico primario en oncología de precisión.

UPR (*Unfolded Protein Response*) Respuesta coordinada al estrés del RE activada por acúmulo de proteínas mal plegadas; mediada por IRE1α, PERK y ATF6; expande la capacidad del RE; si fracasa, activa la apoptosis; implicada en diabetes tipo 2 y neurodegeneración.

Zimógeno Proenzima sintetizada en forma inactiva y activada irreversiblemente por proteólisis limitada; ejemplos: tripsinógeno

→tripsina, proinsulina →insulina; mecanismo de protección contra autodigestión o activación prematura.

9.13 Resumen

Las modificaciones postraduccionales transforman el polipéptido recién sintetizado en una proteína activa con localización, actividad y vida media reguladas. La fosforilación, mediada por ∼500 cinasas humanas, constituye el principal mecanismo de señalización intracelular y la diana más explotada en farmacología oncológica. La glicosilación N-ligada, iniciada en el RE rugoso, determina el plegamiento, la estabilidad y la farmacocinética de las proteínas secretadas y los biofármacos; su control de calidad es una tarea central del bioquímico farmacéutico en la industria biotecnológica.

El plegamiento correcto de las proteínas depende de las chaperonas moleculares: Hsp70 actúa por ciclos de unión/liberación ATP-dependientes en el ribosoma y bajo estrés; las chaperoninas Hsp60/GroEL proveen un ambiente aislado para el plegamiento sin riesgo de agregación. Cuando el control de calidad del RE es superado, la UPR activa mecanismos adaptativos (ERAD, expansión del RE, reducción de traducción) y, en último caso, apoptosis.

El sistema ubiquitina-proteasoma, con más de 600 E3-ligasas, degrada selectivamente proteínas marcadas con cadenas K48 de poliubiquitina, regulando el ciclo celular, la señalización y la calidad proteica. Su inhibición por bortezomib ha transformado el tratamiento del mieloma múltiple, y la nueva clase de PROTACs extiende esta estrategia a proteínas previamente no drogables. Las proteinopatías —Alzheimer,

Parkinson, enfermedades priónicas, fibrosis quística— ilustran las consecuencias devastadoras del fallo en estos sistemas de control de calidad, y al mismo tiempo señalan las dianas para las próximas generaciones de terapias dirigidas.

CAPÍTULO X

10 EPIGENÉTICA, SILENCIAMIENTO GÉNICO Y DESREGULACIÓN EN ENFERMEDAD

En el capítulo anterior se describió cómo las proteínas son modificadas covalentemente y cómo su plegamiento correcto es esencial para la función celular. Este capítulo amplía esa perspectiva hacia el nivel del genoma: las marcas epigenéticas —metilación del ADN, modificaciones de histonas y ARN no codificantes— determinan qué genes se expresan sin alterar la secuencia del ADN. Comprender esta capa de regulación es fundamental para el bioquímico farmacéutico, pues el epigenoma es reversible y, por ello, una diana terapéutica de primer orden en oncología y en enfermedades del desarrollo.

10.1 Introducción

El término *epigenética* fue acuñado por Conrad Waddington en 1942 para describir los procesos por los cuales el genotipo da lugar al fenotipo durante el desarrollo (Alberts et al., 2022). En su definición molecular moderna, la epigenética abarca los cambios heredables en la expresión génica que no implican alteración de la secuencia del ADN (Lewin et al., 2022). Estas marcas incluyen tres mecanismos principales: la metilación del ADN en citosinas, las modificaciones covalentes de las histonas y los ARN no codificantes (ARNnc).

La importancia clínica del epigenoma es doble. Por un lado, las marcas epigenéticas son esenciales para los procesos de diferenciación celular,

la inactivación del cromosoma X y la impronta genómica (introducida en el capítulo 6).

Por otro lado, su alteración está en la raíz de múltiples enfermedades: la hipermetilación de islas CpG silencia genes supresores de tumores en el cáncer; las enzimas que escriben o borran marcas de histonas son con frecuencia mutadas o sobreexpresadas en neoplasias hematológicas (Nussbaum et al., 2016).

El bioquímico farmacéutico participa en este campo diseñando y controlando fármacos epigenéticos —inhibidores de histona deacetilasas (HDAC) y agentes desmetilantes— que ya forman parte de los protocolos estándar de tratamiento en leucemias y síndromes mielodisplásicos (Relling & Evans, 2015).

10.2 Objetivos de Aprendizaje

Describir los mecanismos de metilación del ADN e identificar la función de las enzimas DNMT1, DNMT3A y DNMT3B en el mantenimiento y establecimiento de las marcas epigenéticas.

Explicar el código de histonas relacionando modificaciones específicas con estados de cromatina activa (eucromatina) o reprimida (heterocromatina).

Analizar el papel de los ARN no codificantes (miARN, lncARN) en el silenciamiento epigenético y su relevancia como biomarcadores. Comprender los mecanismos de inactivación del cromosoma X y de impronta genómica como ejemplos de epigenética fisiológica.

Relacionar la desregulación epigenética con oncogénesis y con enfermedades del desarrollo, aplicando este conocimiento a la evaluación de dianas terapéuticas farmacológicas.

Preguntas de Enfoque

1. ¿En qué se diferencia la regulación epigenética de la regulación transcripcional clásica estudiada en el capítulo 8?

2. ¿Por qué la metilación del ADN es considerada una marca epigenética «silenciadora» cuando ocurre en islas CpG de promotores?

3. ¿Cómo puede una célula embrionaria y una célula diferenciada adulta poseer el mismo genoma y, sin embargo, expresar conjuntos completamente diferentes de proteínas?

4. ¿Qué implicaciones tiene para la farmacología el hecho de que el epigenoma sea reversible, a diferencia de las mutaciones del ADN?

5. ¿Por qué la reactivación epigenética de genes supresores de tumores es una estrategia terapéutica prometedora en oncología?

10.3 Metilación del ADN: escritura, lectura y borrado

La metilación del ADN consiste en la adición covalente de un grupo metilo (—CH3) al carbono 5 de la citosina, generando 5-metilcitosina (5mC), en el contexto de dinucleótidos CpG (Alberts et al., 2022; Lodish et al., 2021). Esta reacción es catalizada por las ADN metiltransferasas (DNMT) utilizando S-adenosilmetionina (SAM) como donante de metilo.

10.3.1 Familia de las DNMT

Las enzimas DNMT se clasifican en dos grupos funcionales:

DNMT3A y DNMT3B (metilasas *de novo*): establecen nuevas marcas de metilación durante el desarrollo embrionario y la gametogénesis. Actúan sobre ADN no metilado o hemimetilado y son esenciales para la impronta genómica y la inactivación del cromosoma X (Lewin et al., 2022).

DNMT1 (metilasa de mantenimiento): restaura la metilación en la hebra recién sintetizada durante la replicación del ADN. Reconoce el ADN hemimetilado (hebra molde metilada, hebra hija no metilada) y es reclutada por PCNA en la horquilla de replicación (Karp et al., 2019).

La desmetilación puede ser pasiva (dilución de marcas durante la replicación en ausencia de DNMT1) o activa, mediada por las enzimas TET (TET1, TET2, TET3), que oxidan 5mC a 5-hidroximetilcitosina (5hmC) y productos subsiguientes que son eliminados por la vía de reparación por escisión de bases (Alberts et al., 2022).

10.3.2 Islas CpG y metilación del promotor

Los dinucleótidos CpG no se distribuyen uniformemente en el genoma: están subrepresentados por procesos evolutivos (la metilación de citosinas es mutagénica por desaminación espontánea a timina). Sin embargo, existen regiones ricas en CpG —las **islas CpG**— de 0,5 kb a 2 kb de longitud que coinciden con el promotor del 60 % de los genes humanos (Lewin et al., 2022).

En condiciones normales, las islas CpG de promotores activos están **hipometiladas**, permitiendo el acceso de factores de transcripción. Cuando estas islas son metiladas, la región promotora queda silenciada por dos mecanismos complementarios (Lodish et al., 2021):

1. El grupo metilo obstruye físicamente la unión de factores de transcripción que requieren motivos CpG sin metilar.

2. Las proteínas de unión a metil-CpG (MBD: MeCP2, MBD1–4) reclutan complejos de remodelación de cromatina con actividad HDAC, compactando la cromatina localmente.

Concepto Clave

Las islas CpG en promotores activos están hipometiladas en condiciones fisiológicas. Su hipermetilación silencia el gen: primero bloquea la unión de factores de transcripción y luego recluta desacetilasas de histonas que compactan la cromatina. Este mecanismo es explotado por las células tumorales para silenciar genes supresores.

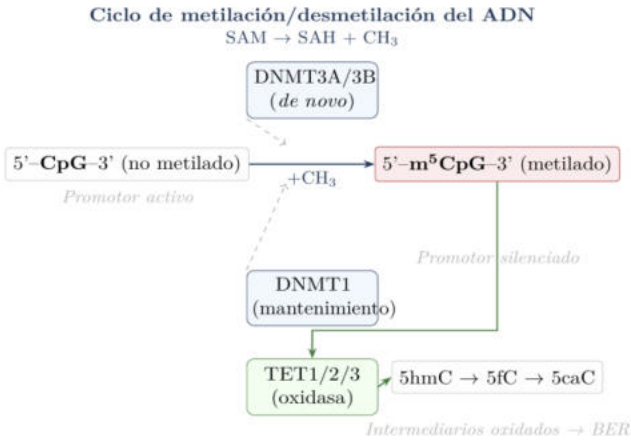


Figura 28. Ciclo de metilación y desmetilación del ADN.

La metilación *de novo* es realizada por DNMT3A/3B con SAM como donante de metilo; DNMT1 restaura la marca tras la replicación. Las enzimas TET oxidan la 5-metilcitosina hasta intermediarios que son eliminados por reparación por escisión de bases (BER). Elaboración propia basada en Alberts et al. (2022) y Lewin et al. (2022).

10.4 Código de histonas: escritura, lectura y borrado

Las histonas son proteínas básicas altamente conservadas cuyos dominios amino- terminales («colas») sobresalen del nucleosoma y son susceptibles de numerosas modificaciones covalentes postraduccionales (Alberts et al., 2022). La hipótesis del **código de histonas** postula que combinaciones específicas de estas marcas son reconocidas por proteínas efectoras que traducen la señal en estados transcripcionales concretos (Karp et al., 2019).

10.4.1 Tipos de modificaciones y enzimas escritoras

Tabla 10.1: *Principales modificaciones de histonas, enzimas asociadas y efecto sobre la cromatina*

Modificación Escritoras Borradoras Efecto funcional

Acetilación (K) HAT (p300, CBP, GCN5) HDAC (clases I–IV, sirtuinas) Activa; neutraliza carga +, abre cromatina Metilación H3K4 SET1, MLL1–4 KDM5 (JARID1) Activa; marca promotores activos (me3) y potenciadores (me1) Metilación H3K9 G9a, SUV39H1 KDM3 (JHDM2) Reprime; recluta HP1, forma heterocromatina Metilación H3K27 EZH2 (PRC2) KDM6A/B (UTX) Reprime; marca genes del desarrollo silenciados por Polycomb Metilación H3K36 NSD1, SETD2 KDM2B Activa; cuerpo del gen transcrito (elongación) Fosforilación H3S10 Aurora B PP1, PP2A Condensación mitótica; también co-activa ciertos genes Ubiquitinación H2AK119 Ring1A/B (PRC1) USP16, BAP1 Reprime; coopera con H3K27me3

Nota. K = lisina; S = serina; me1/2/3 = mono/di/trimetilación; HAT = histona acetiltransferasa; HDAC = histona deacetilasa; KDM = lisina desmetilasa. Elaboración propia basada en Alberts et al. (2022) y Lewin et al. (2022).

10.4.2 Lectura del código: dominios efectores

Las marcas de histonas son leídas por dominios proteicos especializados (Lodish et al., 2021):

Bromodominio: reconoce lisinas acetiladas. Presente en factores de remodelación como SWI/SNF y en la bromodomaina BRD4 (diana del fármaco JQ1).

Cromodominio: reconoce lisinas metiladas. HP1 une H3K9me3; Pc (Polycomb) une H3K27me3.

PHD *finger*: reconoce H3K4me3 en promotores activos; presente en TAF3 y en complejos NuRD.

PWWP y Tudor: reconocen H3K36me3 y H4K20me2, respectivamente, asociándose a la elongación transcripcional y a la reparación del ADN.

Concepto Clave

El código de histonas opera como un sistema combinatorio: la misma marca puede tener efectos opuestos según el contexto. H3K4me3 activa la transcripción, pero H3K9me3 la reprime. La lectura simultánea de múltiples marcas por complejos multiproteicos garantiza la especificidad de la respuesta.

10.4.3 Complejos Polycomb y Trithorax: la memoria epigenética del desarrollo

Dos familias de complejos proteicos antagonistas regulan el destino celular durante el desarrollo (Alberts et al., 2022):

Complejos Polycomb (PcG): PRC2 (con EZH2 como subunidad catalítica) trimetila H3K27, reclutando PRC1 que ubiquitina H2AK119. Este par de marcas condensa la cromatina y silencia

establemente los genes de identidad celular incompatibles con el linaje en desarrollo.

Complejos Trithorax (TrxG): depositan H3K4me3 y acetilación en promotores activos, manteniendo encendidos los genes de especificación del linaje correcto.

Esta oposición PcG/TrxG genera una «memoria celular» transgeneracional que transmite el estado transcripcional de madre a hija durante las divisiones mitóticas.

¡Importante!

EZH2 en oncología: EZH2 está sobreexpresado o mutado en linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular y múltiples tumores sólidos. La ganancia de función de EZH2 hipermetila H3K27 en genes supresores de tumores, silenciándolos. Tazemetostat (inhibidor de EZH2, aprobado FDA 2020) es el primer fármaco epigenético dirigido a esta diana (Weinshilboum & Wang, 2017).

10.5 ARN no codificantes en regulación epigenética

Los ARN no codificantes (ARNnc) constituyen la mayoría del transcriptoma humano, aunque solo una fracción menor se traduce a proteína (Lodish et al., 2021). Varios tipos actúan directamente sobre la cromatina.

10.6 MicroARN (miARN) — mecanismo y relevancia

Los miARN son ARN de 19 nt a 22 nt que regulan post-transcripcionalmente cientos de ARNm diana (capítulo 8). Su

biogénesis y mecanismo de silenciamiento fueron descritos en el capítulo anterior; aquí se enfatiza su papel epigenético como reguladores de las propias enzimas DNMT y HDAC:

miR-29 inhibe DNMT3A y DNMT3B; su pérdida en leucemias mieloide aguda favorece la hipermetilación global (Lewin et al., 2022).

miR-34a suprime HDAC1 y SIRT1, favoreciendo la acetilación y expresión de genes proapoptóticos; es silenciado por metilación en múltiples tumores. miR-101 inhibe EZH2; su deleción cromosómica en cáncer de vejiga conduce a ganancia de función de PRC2.

10.6.1 ARN largos no codificantes (lncARN)

Los lncARN (>200 nt) actúan como andamios moleculares que reclutan complejos de modificación de cromatina a loci específicos (Alberts et al., 2022):

XIST: lncARN de 17 kb codificado en el cromosoma X. Recubre en *cis* el cromosoma X inactivo, reclutando PRC2 (H3K27me3) y DNMT3A, generando el cuerpo de Barr (sección 10.4).

HOTAIR: lncARN codificado en el locus HOXC; actúa en *trans* sobre el locus HOXD, reclutando PRC2 para su represión. Sobreexpresado en cáncer de mama; predice metástasis.

H19: lncARN improntado (expresado del alelo materno) que regula en *cis* la expresión de IGF2 (sección 10.4.2).

NEAT1: componente estructural de los paraspeckles nucleares; retiene ARNm en el núcleo bajo estrés.

¿Sabías que. . . ?

El transcriptoma humano incluye más de 50 000 loci de lncARN anotados en GENCODE, pero la función de la mayoría sigue siendo desconocida. Paradójicamente, los lncARN evolucionan más rápido que las proteínas y muestran expresión altamente específica de tejido, lo que los convierte en candidatos ideales como biomarcadores de diagnóstico o dianas terapéuticas (Lodish et al., 2021).

10.6.2 ARN de interferencia de Piwi (piARN)

Los piARN (24 nt a 31 nt) son expresados principalmente en la línea germinal y silencian transposones mediante guía de la maquinaria PIWI hacia sus transcritos (Lewin et al., 2022). La vía piARN–PIWI también induce metilación de ADN *de novo* en transposones, protegiendo la integridad del genoma germinal.

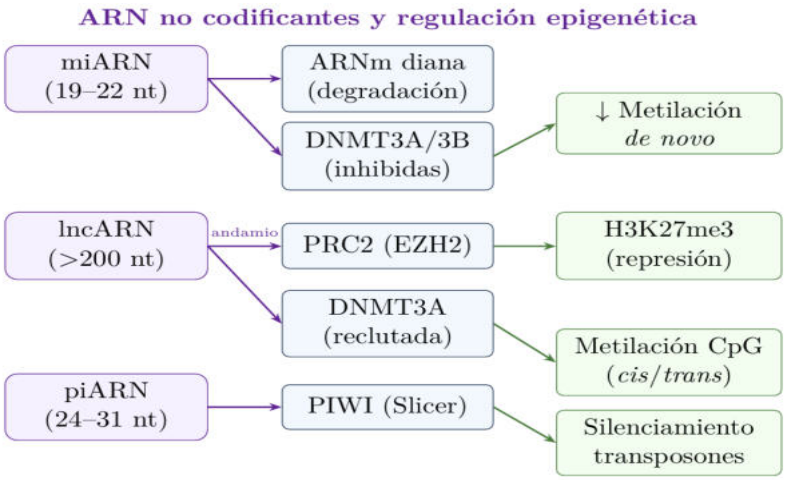


Figura 29. ARN no codificantes como reguladores epigenéticos.

Los miARN actúan post-transcripcionalmente e inhiben enzimas epigenéticas; los lncARN actúan como andamios que dirigen complejos modificadores de cromatina (PRC2, DNMT3A) a loci específicos; los piARN silencian transposones en línea germinal. Elaboración propia basada en Alberts et al. (2022) y Lodish et al. (2021).

10.7 Epigenética fisiológica: inactivación del X e impronta genómica

10.7.1 Inactivación del cromosoma X: hipótesis de Lyon

En mamíferos hembra (46,XX), uno de los dos cromosomas X es inactivado en cada célula somática durante el desarrollo embrionario temprano —alrededor del día 16 en humanos. Este proceso, descrito por Mary Lyon en 1961, genera el **cuerpo de Barr** (cromatina sexual),

visible como un gránulo de heterocromatina en la periferia nuclear (Strachan & Read, 2019).

Mecanismo molecular de la inactivación:

1. **Conteo del número de X:** la célula establece el número de copias activas ($n-1$) mediante señales del *X-inactivation center* (XIC), locus que contiene los genes *XIST* y *TSIX* (Lewin et al., 2022).

2. **Elección alélica:** normalmente al azar (en cada célula se inactiva el X materno o el paterno con probabilidad similar), salvo en la placenta (preferencial).

3. **Propagación:** XIST recubre en *cis* el cromosoma X inactivo (Xi); DNMT3A metila sus islas CpG; EZH2 deposita H3K27me3; la deacetilación de histonas compacta la cromatina en heterocromatina facultativa.

4. **Mantenimiento:** DNMT1 perpeta la metilación en cada división mitótica; HP1 mantiene el estado compacto.

No todos los genes del Xi son silenciados: alrededor del 15 % escapan a la inactivación (regiones pseudoautosómicas y otros loci), lo que explica parte del fenotipo del síndrome

de Turner (45,X) (Nussbaum et al., 2016).

Concepto Clave

La inactivación del cromosoma X es el ejemplo más elegante de epigenética a escala cromosómica: un ARN largo no codificante

(XIST) desencadena una cascada de modificaciones de histonas y metilación del ADN que silencia >1000 genes en uno de los cromosomas, manteniendo ese estado en todas las divisiones subsiguientes.

10.7.2 Impronta genómica: expresión monoalélica dependiente del parental

La impronta genómica es la expresión preferencial o exclusiva de uno de los dos alelos de un gen dependiendo de su origen parental (materno o paterno). Afecta a ∼100 genes en el genoma humano y es esencial para el desarrollo (Strachan & Read, 2019).

Mecanismo: durante la gametogénesis, las regiones de control de la impronta (ICR) reciben marcas de metilación en uno solo de los dos gametos:

La ICR de la región 11p15.5 está metilada en el gameto paterno: silencia *H19* (lncARN materno) y permite la expresión de *IGF2* (factor de crecimiento paternalmente expresado). En el alelo materno, la ICR no metilada permite la expresión de *H19*, que actúa como competidor del enlazador de insulina (*CTCF*) e impide la activación de *IGF2* (Nussbaum et al., 2016).

Las enfermedades de impronta introducidas en el capítulo 6 (Prader-Willi, Angelman, Beckwith-Wiedemann) resultan de alteraciones de estas ICR —ya sea por mutación, deleción, disomía uniparental o defecto de metilación— que desestabilizan el balance de expresión monoalélica.

10.8 Desregulación epigenética en cáncer

El cáncer es fundamentalmente una enfermedad de la regulación génica. Las alteraciones epigenéticas preceden en muchos casos a las mutaciones somáticas y cooperan con ellas en el proceso de transformación maligna (Watson et al., 2014).

10.8.1 Hermetilación de promotores de genes supresores de tumores

La hipermetilación de islas CpG en genes supresores de tumores es uno de los hallazgos epigenéticos más reproducibles en oncología (Lodish et al., 2021):

Tabla 10.2: *Genes supresores de tumores frecuentemente silenciados por hipermetilación de promotor en cáncer humano*

Gen Función normal Tumor(es) asociados Consecuencia funcional

CDKN2A (p16) Inhibidor CDK4/6 Melanoma, pulmón, mama Hiperproliferación

MLH1 Reparación MMR CCR esporádico, endometrio Inestabilidad microsatélites *BRCA1* Reparación HR Mama, ovario Inestabilidad genómica *RASSF1A* Señalización RAS Pulmón, hígado, mama Activación RAS constitutiva *VHL* Ubiquitinación HIF-1α Carcinoma células claras renales Hipoxia pseudofisiológica *APC* Degradación β-catenina CCR Activación Wnt constitutiva

Nota. CCR = cáncer colorrectal; HR = recombinación homóloga; MMR = reparación de bases no apareadas. Elaboración propia basada en Lodish et al. (2021) y Watson et al. (2014).

10.8.2 Hipometilación global del genoma tumoral

Paradójicamente, los tumores muestran simultáneamente hipometilación global (en cuerpos de genes y regiones repetitivas LINE/SINE) e hipermetilación local de promotores supresores. La hipometilación global contribuye a la inestabilidad genómica al reactivar transposones y facilitar la recombinación ectópica (Karp et al., 2019).

10.8.3 Mutaciones en escritores y borradores epigenéticos

Las enzimas epigenéticas son frecuentemente mutadas en cáncer (Weinshilboum & Wang, 2017):

DNMT3A R882H: presente en 20 % de leucemias mieloides agudas (LMA); hipometilación focal de genes de diferenciación. **TET2**: mutado en 20 % de LMA y en neoplasias mieloproliferativas; pérdida de 5hmC y bloqueo de diferenciación. **IDH1/IDH2**: mutaciones neomórficas producen 2-hidroxiglutarato (2HG), oncometabolito que inhibe las enzimas TET y KDM; genera el fenotipo hipometilador «CIMP» en gliomas y LMA.

EZH2 Y646: ganancia de función en linfoma folicular; sobresilencia genes de diferenciación linfoide B. **KDM6A (UTX)**: pérdida de función en múltiple mieloma y leucemia linfoblástica aguda; no borra H3K27me3, acumulación represiva.

¡Importante!

Mutaciones de IDH1/IDH2 e inhibidores disponibles: Ivosidenib (IDH1) y enasidenib (IDH2) son inhibidores aprobados por la FDA para LMA con mutación respectiva. Bloquean la producción del oncometabolito 2HG, restauran la actividad TET y rellevan la diferenciación mieloide bloqueada. Son paradigmas de terapia dirigida a la función epigenética en oncohematología (Relling & Evans, 2015).

10.9 Terapias epigenéticas: inhibidores de HDAC y agentes desmetilantes

La reversibilidad del epigenoma lo convierte en una diana farmacológica única: a diferencia de las mutaciones del ADN, las marcas epigenéticas pueden modificarse con fármacos (Relling & Evans, 2015; Weinshilboum & Wang, 2017).

10.9.1 Inhibidores de HDAC (HDACi)

Las HDAC eliminan grupos acetilo de lisinas de histonas, compactando la cromatina y reprimiendo genes. Los HDACi provocan hiperacetilación generalizada, abriendo la cromatina y reactivando genes silenciados (Harvey, 2019):

Vorinostat (SAHA): primer HDACi aprobado (FDA 2006); indicado en linfoma cutáneo de células T (LCCT). Inhibidor pan-HDAC (clases I/II). **Romidepsina:** depsipéptido bicíclico, inhibe HDAC clase I; LCCT y linfoma T periférico. **Panobinostat:** pan-HDACi aprobado en mieloma múltiple refractario en combinación con bortezomib.

Entinostat, mocetinostat: HDACi selectivos clase I en investigación para tumores sólidos.

Los HDACi activan también genes proapoptóticos (*BIM*, *NOXA*) y antiproliferativos (*p21^(WAF1)*), contribuyendo a su eficacia antitumoral (Weinshilboum & Wang, 2017).

10.9.2 Agentes desmetilantes del ADN (hipometilantes)

Los análogos de citidina 5-azacitidina (azacitidina) y 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina) se incorporan al ADN durante la replicación y forman aductos covalentes irreversibles con DNMT1, impidiendo la metilación de mantenimiento (Harvey, 2019). El resultado es una desmetilación pasiva progresiva en cada ciclo celular, con reactivación de genes supresores silenciados:

Azacitidina: aprobada para síndromes mielodisplásicos (SMD) de alto riesgo y LMA inelegible para quimioterapia intensiva. **Decitabina:** indicada en SMD, LMA del anciano; también activa *CDKN2A* y *MLH1* en varios tipos tumorales.

Aplicación para el Bioquímico Farmacéutico

El bioquímico farmacéutico en la monitorización de terapias epigenéticas: La eficacia de los agentes hipometilantes puede evaluarse midiendo el índice de metilación global (LINE-1 methylation assay) o la metilación específica de genes diana (*CDKN2A*, *MLH1*) en ADN de células mononucleares periféricas o médula ósea mediante pirosecuenciación bisulfito. El BQF también cuantifica la expresión de genes reactivados por RT-qPCR y mide

marcadores plasmáticos (IL-6, β2microglobulina) como sustitutos de respuesta clínica en SMD y LMA (Relling & Evans, 2015; Weinshilboum & Wang, 2017).

10.9.3 Inhibidores de EZH2, BRD4 y otras dianas epigenéticas emergentes

Tazemetostat (EZH2i): aprobado en linfoma epitelioide y sarcoma. Ejemplo de inhibidor de escritor de histonas. **JQ1 (BRD4i):** inhibidor de bromodominio en investigación; bloquea la lectura de H3K27ac en superenhancers de *MYC* en linfoma de Burkitt y mieloma. **Ivosidenib / enasidenib (IDH1/IDH2i):** restauran la actividad TET y la diferenciación mieloide (véase sección 10.5.3). **Pinometostat (DOT1Li):** inhibe la metilación de H3K79 en LMA con reordenamientos de *KMT2A* (MLL).

Caso Clínico

Caso clínico 10.1 — Síndrome mielodisplásico con mutación DNMT3A Presentación: Mujer de 68 años con historia de 4 meses de fatiga progresiva, equimosis espontáneas y epistaxis recurrente. Hemograma: Hb 8,1 g/dL, plaquetas 52 × 10^9 L^(−)¹, neutrófilos 1,1 × 10^9 L^(−)¹. Frotis: diseritropoyesis con macrovalocitos y neutrófilos hiposegmentados. Blastos 4 % en médula ósea.

Estudio molecular: Panel NGS de SMD detecta mutación somática *DNMT3A* p.R882H (VAF 42 %) y *TET2* c.2527A>T (VAF 38 %). Cariotipo 46,XX. IPSS-R: riesgo intermedio.

Análisis epigenético: pirosecuenciación bisulfito de *LINE-1*: metilación global 58 % (referencia >75 %); metilación *CDKN2A*: 81 % (silenciado). RT-qPCR: expresión *CDKN2A* ausente.

Tratamiento y monitorización:

1. Azacitidina 75 mg/m² SC días 1–7 de cada ciclo de 28 días.

2. Evaluación de respuesta a los 4–6 ciclos (criterios IWG 2006).

3. Control de metilación LINE-1 y expresión *CDKN2A* cada 2 ciclos.

Evolución: Tras 4 ciclos, LINE-1 aumenta a 68 %; expresión *CDKN2A* recuperada; plaquetas 98 × 10^9 L^(−)¹. Respuesta hematológica mayor.

Preguntas de razonamiento:

1. ¿Por qué la mutación DNMT3A R882H causa hipometilación focal si DNMT3A es una metilasa?

2. ¿Qué consecuencias tiene la coexistencia de mutaciones DNMT3A y TET2 en el mismo clon sobre el estado de metilación global?

3. ¿Por qué la metilación de LINE-1 es un biomarcador útil para monitorizar la respuesta a azacitidina?

Concepto Clave

Eje central del capítulo: El epigenoma es la capa de información hereditaria que determina qué genes se expresan sin alterar la secuencia del ADN. Opera mediante tres mecanismos moleculares

integrados —metilación del ADN, código de histonas y ARN no codificantes— que configuran el estado de la cromatina y definen la identidad celular. Su desregulación en cáncer es tratable con fármacos aprobados, estableciendo al epigenoma como una de las fronteras más productivas de la farmacología molecular contemporánea.

10.10 Actividades de Consolidación

Actividad 1 — Análisis de metilación por pirosecuenciación bisulfito

Objetivo: Interpretar los resultados de un ensayo de metilación específica de loci CpG en muestras clínicas de pacientes con síndrome mielodisplásico.

Instrucciones:

1. Revisar el protocolo de conversión con bisulfito sódico: las citosinas no metiladas se convierten en uracilo (luego timina tras PCR); las 5-metilcitosinas permanecen inalteradas.

2. Analizar un pirograma simulado con valores de metilación en 5 posiciones CpG del promotor de *CDKN2A*: 8 %, 12 %, 10 %, 9 %, 11 %. Calcular el índice de metilación promedio y clasificar el locus como hipometilado (< 20 %), intermedio o hipermetilado (> 70 %).

3. Comparar con un segundo paciente con valores: 82 %, 79 %, 85 %, 77 %, 81 %. ¿Cuál presenta mayor probabilidad de silenciamiento de p16?

4. Discutir las limitaciones de la pirosecuenciación bisulfito frente a la secuenciación bisulfito de genoma completo (WGBS) en el contexto diagnóstico.

Entregable: Tabla comparativa de índices de metilación, interpretación clínica y propuesta de seguimiento farmacológico para el caso con hipermetilación confirmada.

Actividad 2 — Mapeo del perfil epigenético en líneas celulares

Objetivo: Diseñar un experimento de ChIP-seq para detectar marcas H3K27me3 y H3K4me3 en una línea celular de linfoma difuso de células B grandes con sospecha de ganancia de función de EZH2.

Instrucciones:

1. Describir el protocolo básico de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP): reticulado formaldehído, sonicación, inmunoprecipitación con anticuerpo H3K27me3, dereticulado y secuenciación.

2. Identificar regiones de interés: loci donde H3K27me3 aumenta y H3K4me3 disminuye en la muestra tumoral vs. células B normales.

3. Proponer qué genes supresores específicos podrían estar silenciados si EZH2 es hiperactivado.

4. Evaluar si el tratamiento con tazemetostat restauraría H3K4me3 en los promotores identificados.

Entregable: Diseño experimental con controles (IgG, H3 total), análisis bioinformático esperado (picos ChIP) e interpretación funcional de los resultados.

10.11 Preguntas de Autoevaluación

A. Selección Múltiple

1. ¿Cuál de las siguientes enzimas es responsable de la metilación de mantenimiento del ADN durante la replicación?

a) DNMT3A

b) DNMT3B

c) **DNMT1**

d) TET2

2. La marca de histona H3K27me3 es depositada por el complejo PRC2 y tiene como efecto principal:

a) Activación transcripcional del gen

b) **Represión génica; reclutamiento de PRC1 y compactación de cromatina**

c) Señalización de condensación mitótica

d) Marcaje de genes para reparación por escisión de bases

3. En la inactivación del cromosoma X, el lncARN XIST actúa:

a) En *trans*, silenciando genes del cromosoma Y

b) **En *cis*, recubriendo el cromosoma X inactivo y reclutando PRC2 y DNMT3A**

c) Como miARN precursor que inhibe DNMT1

d) Como piARN que silencia transposones del cromosoma X

4. Un paciente con LMA porta la mutación IDH2 R140Q. El oncometabolito producido (2-hidroxiglutarato) inhibe principalmente:

a) DNMT1 y DNMT3B

b) EZH2 y PRC1

c) **Las enzimas TET y las lisinas desmetilasas (KDM)**

d) Las histona acetiltransferasas (HAT)

5. La hipermetilación del promotor de *MLH1* en cáncer colorrectal esporádico tiene como consecuencia directa:

a) Sobreexpresión de MLH1 y errores de replicación b) Activación del oncogén *KRAS*

c) **Deficiencia en reparación de bases no apareadas (MMR) e inestabilidad de microsatélites**

d) Pérdida de la función de BRCA1 y mayor inestabilidad cromosómica

6. El fármaco vorinostat (SAHA) actúa inhibiendo:

a) DNMT1 (metilasa de mantenimiento)

b) **Las histona deacetilasas (HDAC), causando hiperacetilación y activación transcripcional**

c) EZH2 (H3K27 metiltransferasa)

d) El bromodominio de BRD4

7. En la impronta genómica del locus 11p15.5, el gen *IGF2* se expresa del alelo paterno porque en ese alelo la ICR está:

a) No metilada, permitiendo a CTCF bloquear el promotor de IGF2

b) Activamente desmetilada por TET2 después de la fertilización

c) **Metilada, impidiendo la unión de CTCF y la expresión de H19, lo que libera el promotor de IGF2**

d) Marcada con H3K4me3, activando directamente la transcripción

8. Un lncARN que actúa como andamio molecular para reclutar PRC2 al locus HOXD desde el locus HOXC (acción en *trans*) es:

a) XIST b) H19

c) NEAT1

d) **HOTAIR**

B. Verdadero o Falso

1. **Afirmación:** La azacitidina y la decitabina actúan como agentes desmetilantes activos que eliminan directamente los grupos metilo de la citosina en el ADN ya replicado.

Respuesta: **Falso.** Azacitidina y decitabina son análogos de citidina que se incorporan al ADN durante la síntesis y forman complejos covalentes irreversibles con DNMT1, impidiendo la metilación de mantenimiento. La desmetilación es *pasiva*: ocurre por dilución de las marcas en cada ciclo de replicación, no por eliminación activa de grupos metilo ya instalados (Harvey, 2019).

2. **Afirmación:** Todas las células somáticas de una mujer tienen el mismo cromosoma X inactivo (el materno o el paterno uniformemente).

Respuesta: **Falso.** La inactivación del X es al azar en cada célula embrionaria; las células hija propagan la misma elección (clonal), pero diferentes tejidos pueden mostrar proporciones variables de células con Xi materno o Xi paterno (mosaicismosomático). Solo en la placenta la inactivación es preferencial (siempre Xi paterno) (Strachan & Read, 2019).

3. **Afirmación:** La pérdida de la enzima TET2 en células hematopoyéticas resulta en hipometilación global del ADN, lo que favorece la transformación leucémica.

Respuesta: **Falso.** TET2 convierte 5-metilcitosina en 5-hidroximetilcitosina, promoviendo la desmetilación. Su pérdida causa

*hiper*metilación relativa de genes de diferenciación, bloqueando la maduración mieloide y favoreciendo la expansión del clon hematopoyético. La hipometilación global es característica de pérdida de DNMT3A, no de TET2 (Lewin et al., 2022).

C. Análisis de Casos

1. **Caso:** En un estudio de cohorte de pacientes con linfoma folicular se identifica una mutación somática *EZH2* Y641N en el 20 % de los casos. Los tumores con esta mutación muestran H3K27me3 marcadamente elevada y peor pronóstico.

Preguntas:

a) Explique por qué la mutación Y641N es una mutación de ganancia de función, no de pérdida de función, a pesar de que altera el sitio catalítico de EZH2.

b) Identifique al menos dos genes supresores de tumores que probablemente estarían silenciados por el exceso de H3K27me3.

c) Proponga un algoritmo de tratamiento que incluya un epigenético y justifique su selección basándose en el mecanismo molecular.

2. **Caso:** Un laboratorio de diagnóstico molecular detecta mediante secuenciación bisulfito que el promotor de *CDKN2A* está metilado al 85 % en ADN circulante (ctDNA) de un paciente con antecedente de tabaquismo y nódulo pulmonar de 1,8 cm en TAC. **Preguntas:**

a) ¿Qué valor tiene este hallazgo epigenético en el contexto diagnóstico diferencial entre lesión benigna y carcinoma pulmonar?

b) Si el paciente fuera tratado con decitabina, ¿esperaría ver un aumento o disminución de los niveles plasmáticos de p16? ¿Por qué?

c) ¿Qué otros marcadores epigenéticos en ctDNA (marcas de histonas, fragmentación nucleosomal) podrían complementar el análisis de metilación?

10.12 Glosario

5-metilcitosina (5mC) Forma modificada de la citosina que resulta de la adición de un grupo metilo al carbono 5 por las DNMT. Es la principal marca de metilación del ADN en mamíferos.

Bromodominio Dominio proteico que reconoce y une lisinas acetiladas en histonas. Presente en factores de remodelación cromatínica (SWI/SNF) y en BRD4; diana del fármaco JQ1.

CIMP (*CpG island methylator phenotype*) Fenotipo tumoral caracterizado por hipermetilación simultánea de múltiples islas CpG; presente en gliomas IDHmutados y cánceres colorrectales MLH1-silenciados.

Código de histonas Hipótesis que postula que combinaciones de modificaciones covalentes en las colas de histonas determinan el estado transcripcional de los genes vecinos mediante el reclutamiento de proteínas lectoras específicas.

Cromodominio Dominio proteico que reconoce lisinas metiladas. HP1 utiliza su cromodominio para leer H3K9me3 y propagarla en heterocromatina.

Cuerpo de Barr Estructura de heterocromatina facultativa visible al microscopio óptico en el núcleo de células femeninas; corresponde al cromosoma X inactivo recubierto por XIST y enriquecido en H3K27me3.

Epigenética Estudio de los cambios heredables en la expresión génica que no alteran la secuencia del ADN; incluye metilación del ADN, modificaciones de histonas y ARN no codificantes.

EZH2 Subunidad catalítica del complejo PRC2; metiltransferasa de H3K27. Su ganancia de función en linfoma y pérdida de función en SMD son dianas de fármacos aprobados (tazemetostat, tazemetostat).

Heterocromatina facultativa Regiones genómicas que están condensadas y silenciadas en determinados tipos celulares pero pueden ser reactivadas; ejemplos: cromosoma X inactivo, genes de identidad celular silenciados por PRC2.

Isla CpG Región genómica de 0,5 kb a 2 kb con alta densidad de dinucleótidos CpG, generalmente asociada al promotor de genes constitutivos. Su hipermetilación silencia el gen asociado.

lncARN (*long non-coding RNA*) ARN transcrito >200 nt sin potencial codificante significativo; puede actuar como andamio molecular para complejos de modificación de cromatina o como señuelo de factores de transcripción.

Oncometabolito Metabolito producido en exceso por una enzima mutada neomórficamente que inhibe reacciones bioquímicas normales.

2- hidroxiglutarato (producido por IDH1/2 mutados) inhibe TET y KDM.

Pirosecuenciación bisulfito Técnica que cuantifica el nivel de metilación de CpG individuales; el tratamiento con bisulfito convierte citosinas no metiladas en uracilo, permitiendo distinguirlas de las 5mC por secuenciación.

Polycomb Familia de complejos proteicos (PRC1, PRC2) que silencian genes durante el desarrollo; PRC2 deposita H3K27me3 y PRC1 ubiquitina H2AK119.

TET (ten-eleven translocation) Familia de enzimas (TET1, TET2, TET3) que oxidan 5mC a 5hmC y productos subsiguientes, iniciando la desmetilación activa del ADN.

10.13 Resumen

La epigenética regula la expresión génica a través de tres capas moleculares interconectadas: metilación del ADN, modificaciones de histonas y ARN no codificantes, sin que ninguna de ellas altere la secuencia primaria del genoma. La metilación del ADN, catalizada por DNMT3A/3B (*de novo*) y mantenida por DNMT1 en la replicación, opera principalmente en dinucleótidos CpG: cuando las islas CpG de promotores activos son hipermetiladas, el gen queda silenciado por exclusión estérica de factores de transcripción y reclutamiento de complejos desacetiladores a través de las proteínas MBD. La desmetilación activa, mediada por las enzimas TET, genera intermediarios oxidados que son eliminados por reparación de bases.

El código de histonas añade una segunda dimensión de regulación: acetilación de lisinas (activadora, depositada por HAT y borrada por HDAC), metilación de H3K4 (activadora), H3K9 o H3K27 (represivas) y fosforilación de H3S10 (condensación mitótica) son marcas leídas por dominios bromodomain, cromodomain y PHD que reclutan maquinaria transcripcional o represora. Los complejos PcG/TrxG actúan como la «memoria epigenética» del desarrollo, manteniendo silenciados o activos los genes de identidad celular a través de sucesivas divisiones. Los ARN no codificantes —miARN, lncARN (XIST, HOTAIR, H19) y piARN— orquestan estos procesos reclutando o inhibiendo las enzimas escritoras y borradoras.

Fisiológicamente, la epigenética gobierna dos procesos críticos: la inactivación del cromosoma X (mediada por XIST, que recubre en *cis* el Xi y concentra PRC2 y DNMT3A) y la impronta genómica (marcas de metilación establecidas en el gameto que determinan la expresión monoalélica parental de genes como *IGF2* y *H19*).

En cáncer, las marcas epigenéticas están perturbadas de forma característica: hipermetilación focal de genes supresores (*CDKN2A*, *MLH1*, *BRCA1*) e hipometilación global simultánea; mutaciones en escritores/ borradores (DNMT3A, TET2, EZH2, IDH1/2) bloquean la diferenciación hematopoyética en leucemias. La reversibilidad del epigenoma lo convierte en diana farmacológica: los agentes hipometilantes (azacitidina, decitabina) reactivan genes supresores por desmetilación pasiva; los HDACi (vorinostat, romidepsina, panobinostat) inducen hiperacetilación y reactivación génica; inhibidores de EZH2 (tazemetostat) e IDH (ivosidenib, enasidenib)

representan la nueva generación de epigenéticos dirigidos. Para el bioquímico farmacéutico, el monitoreo de la metilación global (LINE-1) y específica de loci diana mediante pirosecuenciación bisulfito permite evaluar la respuesta a estos tratamientos y detectar la reactivación de genes supresores en tiempo real.

CAPÍTULO XI

11 MUTACIONES, ALTERACIONES MOLECULARES Y VARIABILIDAD BIOLÓGICA

11.1 Mutaciones: Clasificación, Mecanismos Moleculares y Consecuencias Biológicas

El capítulo 10 reveló que la expresión génica puede ser alterada sin modificar la secuencia del ADN mediante mecanismos epigenéticos. Este capítulo aborda la contraparte estructural: las mutaciones, es decir, los cambios permanentes en la secuencia nucleotídica del genoma. Comprender su clasificación, los agentes y procesos que las generan, y los sistemas de reparación que las contrarrestan es fundamental para el bioquímico farmacéutico, que los encontrará diariamente en el diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias, en la farmacogenómica y en la oncología de precisión.

11.2 Introducción

Una mutación es cualquier cambio heredable en la secuencia del ADN de un organismo. Las mutaciones son el motor de la evolución y la base molecular de la diversidad genética, pero también son la causa directa de miles de enfermedades humanas —desde las enfermedades monogénicas clásicas hasta el cáncer— (Strachan & Read, 2019). Su estudio integra conceptos de los capítulos previos: la replicación del ADN (capítulo 4), los sistemas de reparación (capítulo 4), la regulación génica (capítulos 8–10) y los patrones de herencia (capítulos 5–6).

Las mutaciones se clasifican por su extensión (puntuales, de longitud, cromosómicas), por su origen (espontáneas o inducidas), por su efecto sobre la proteína resultante (sinónimas, de sentido erróneo, sin sentido, de cambio de marco) y por su consecuencia fenotípica (silentes, deletéreas, letales, con ganancia o pérdida de función). Cada categoría tiene implicaciones diagnósticas y terapéuticas distintas (Nussbaum et al., 2016).

En la era de la secuenciación de nueva generación (NGS), la identificación de variantes patogénicas es rutinaria en la práctica clínica. El bioquímico farmacéutico debe ser capaz de interpretar un informe de variantes, distinguir variantes de significado incierto (VUS) de variantes patogénicas, y comprender cómo una mutación específica afecta

la farmacogenómica del paciente —su respuesta a fármacos y el riesgo de toxicidad (Relling & Evans, 2015).

11.3 Objetivos de Aprendizaje

Clasificar las mutaciones según su extensión, origen, tipo molecular y consecuencia fenotípica, utilizando la nomenclatura HGVS actualizada.

Describir los mecanismos moleculares de generación de mutaciones espontáneas (tautomería, desaminación, deslizamiento de ADN polimerasa) e inducidas por mutágenos físicos y químicos.

Relacionar los sistemas de reparación del ADN (MMR, NER, BER, HR, NHEJ) con los tipos de lesiones que corrigen y las enfermedades causadas por su déficit.

Analizar cómo las mutaciones puntuales de sentido erróneo o sin sentido pueden traducirse en pérdida o ganancia de función proteica, usando ejemplos clínicos concretos.

Aplicar los principios de interpretación de variantes (criterios ACMG/AMP) en el contexto de la farmacogenómica y el diagnóstico molecular.

Preguntas de Enfoque

1. ¿Por qué no todas las mutaciones en la secuencia codificante de un gen producen un cambio en la proteína? ¿Qué propiedad del código genético lo explica?

2. ¿Cuál es la diferencia entre una mutación de pérdida de función y una de ganancia de función desde el punto de vista clínico y farmacológico?

3. ¿Cómo pueden las variantes en regiones no codificantes del genoma tener consecuencias fenotípicas?

4. ¿Por qué la tasa de mutación en células cancerosas supera en varios órdenes de magnitud la del tejido normal?

5. ¿En qué situaciones clínicas el bioquímico farmacéutico necesita interpretar la patogenicidad de una variante genética?

11.4 Clasificación de las mutaciones

11.4.1 Por extensión: puntuales, de longitud y cromosómicas

Las mutaciones se ordenan jerárquicamente según la escala genómica afectada (Lewin et al., 2022):

1. **Mutaciones puntuales (SNV — Single Nucleotide Variant):** cambio de un único nucleótido. Son las más frecuentes y las mejor caracterizadas clínicamente.

2. **Pequeñas inserciones/deleciones (indels):** adición o pérdida de 1 bp a 50 bp. Si no son múltiplos de 3, generan cambio de marco de lectura.

3. **Variaciones en el número de copias (CNV):** duplicaciones o deleciones de segmentos de >1 kb; pueden incluir genes completos o exones.

4. **Mutaciones cromosómicas:** numéricas (aneuploidías) y estructurales (translocaciones, inversiones, deleciones visibles al cariotipo). Tratadas en el capítulo 7.

11.4.2 Por tipo molecular: consecuencias sobre la proteína

Las mutaciones de secuencia codificante se clasifican según su efecto sobre el codón y la proteína (Nussbaum et al., 2016):

Tabla 19. Clasificación de las mutaciones puntuales según efecto sobre la proteína.

Tipo	Definición	Efecto proteico	Ejemplo clínico
Sinónima (silente)	Cambio nucleotídico que no altera el aminoácido	Ninguno (usualmente)	p.Leu412Leu (c.1236G>A)
Sentido erróneo (missense)	Cambio de un aminoácido por otro	Puede ser deletéreo, neutro o activador	HbS: p.Glu6Val en β-globina
Sin sentido (nonsense)	Cambio a codón de parada prematuro	Proteína truncada; degradada por NMD	Distrofia de Duchenne: p.Arg3417Ter
Cambio de marco (frameshift)	Inserción o deleción no múltiplo de 3	Proteína anómala desde el sitio; NMD frecuente	BRCA1: c.68_69delAG
Del sitio de empalme (splicing)	Altera secuencias donor/acceptor	Retención de intrón, salto de exón, intrones crípticos	CFTR: c.1210-12T[5] (5T variant)
Expansión de repeticiones	Aumento de trinucleótidos repetidos	Proteína con tramos de aminoácidos repetidos; ganancia tóxica	HD: CAG>36 en HTT; FXS: CGG>200 en FMR1

Fuente: Nussbaum et al. (2016) y Strachan & Read (2019).

Nota. NMD = nonsense-mediated decay; HD = enfermedad de Huntington; FXS = síndrome de X frágil.

11.4.3 Por consecuencia fenotípica

La misma mutación puede tener efectos muy diferentes sobre la función proteica (Lodish et al., 2021):

Pérdida de función (LoF): la proteína mutante pierde total o parcialmente su actividad. Si la función remanente del alelo normal no es suficiente (haploinsuficiencia), el fenotipo es dominante. Si ambos alelos deben estar mutados para el fenotipo, es recesivo.

Ganancia de función (GoF): la proteína mutante adquiere una actividad nueva o exacerbada. Generalmente produce fenotipo dominante (un solo alelo mutado es suficiente). Ejemplos: *RAS* G12V (GTPasa constitutivamente activa), *EGFR* L858R (quinasa constitutiva en NSCLC).

Efecto dominante negativo: la proteína mutante inhibe a la proteína silvestre (por competición en homo/heterodímeros). Ejemplo: mutaciones en *TP53* en el dominio de unión al ADN.

Concepto Clave

La misma categoría de mutación (p.ej., *missense*) puede producir pérdida de función, ganancia de función o efecto dominante negativo dependiendo del gen y del dominio afectado. La predicción del efecto requiere combinar el análisis de la posición en la proteína 3D, la conservación evolutiva del residuo y los datos de la literatura clínica.

11.5 Mecanismos de generación de mutaciones espontáneas

Las mutaciones espontáneas surgen de errores intrínsecos en los procesos celulares que manejan el ADN, sin exposición a agentes externos (Watson et al., 2014).

11.5.1 Errores de replicación

A pesar de la fidelidad de las ADN polimerasas (tasa de error ∼10^(−)^{7} sin corrección, ∼10^(−)^{9} con exonucleasa 3'→5' y MMR), la velocidad de replicación del genoma humano (3,2 × 10^{9} bp por ciclo) implica 3–10 mutaciones por división celular (Alberts et al., 2022):

Apareamiento Watson-Crick erróneo: las bases pueden adoptar formas tautoméricas raras (enol/imino) que forman pares no canónicos (A-C, G-T), generando transiciones.

Deslizamiento de la polimerasa (*slippage*): en secuencias repetidas en tándem (STR), la hebra naciente puede «resbalar» hacia atrás o hacia adelante, generando inserciones o deleciones del motivo repetido.

Disociación y repriming: pausa de la horquilla por lesiones o estructuras secundarias del ADN puede generar mutaciones de deleción.

11.5.2 Mutaciones espontáneas no replicativas

Desaminación de citosina: la citosina se desaminiza espontáneamente a uracilo (en ADN de doble hebra, tasa ∼100 /célula/día). Si el uracilo no es reparado por glicosilasa UNG antes de la replicación, el par C:G se convierte en T:A (transición).

Desaminación de 5-metilcitosina: genera timina (no reconocida como lesión por UNG). Es la principal fuente de transiciones CpG>TpG, las mutaciones puntuales más frecuentes del genoma humano.

Depurinación: el enlace N-glucosídico entre una purina (A o G) y la desoxirribosa se hidroliza espontáneamente (10,000/célula/día), generando un sitio AP (*abasic site*) que bloquea la polimerasa o genera errores de inserción (regla A, por Pol η).

Oxidación: el radical hidroxilo (·OH) oxida la guanina a 8-oxo-7,8dihidroguanina (8-oxoG), que se aparea con adenina en lugar de citosina, generando transversiones G:C→T:A.

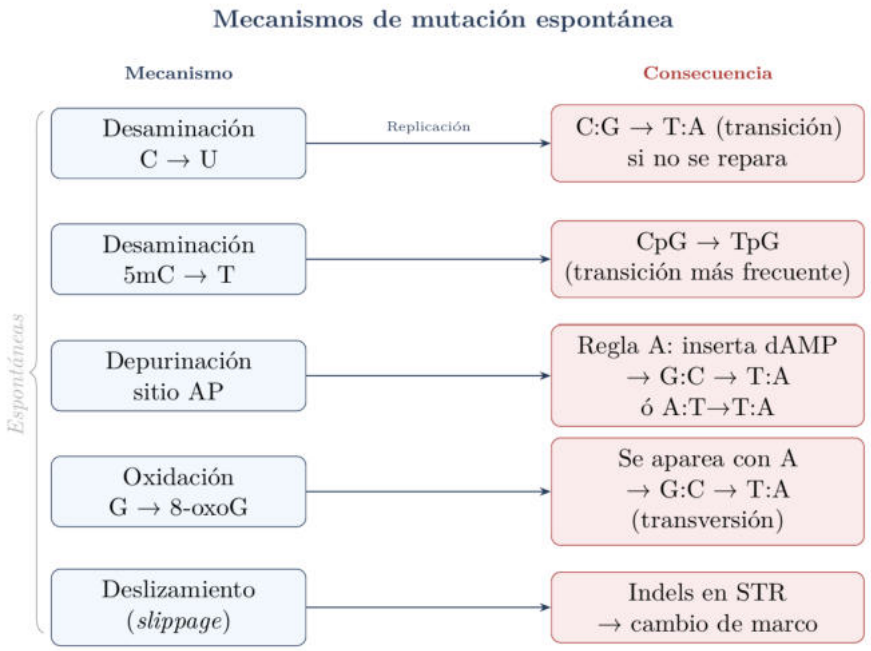


Figura 30. Principales mecanismos de mutación espontánea.

Las fuentes más frecuentes son la desaminación de citosinas y 5-metilcitosinas, la depurinación, la oxidación de guanina y el deslizamiento de la ADN polimerasa en secuencias repetidas. Elaboración propia basada en Watson et al. (2014) y Alberts et al. (2022).

11.6 Mutaciones inducidas: mutágenos físicos, químicos y biológicos

Los mutágenos aumentan la tasa basal de mutación por mecanismos específicos (Lewin et al., 2022; Watson et al., 2014).

11.6.1 Mutágenos físicos

Radiación ultravioleta (UV-B, 260 nm**):** induce la formación de fotoproductos entre pirimidinas adyacentes: dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) y foto-productos 6-4 (6-4PP). Ambos distorsionan la doble hélice e inhiben la ADN polimerasa. Son reparados por NER; su acumulación en *TP53* codón 248 es la firma del melanoma y el carcinoma basocelular.

Radiación ionizante (RX, γ): genera radicales ·OH que oxidan bases (8oxoG), quiebran el azúcar-fosfato (cortes de simple y doble hebra), y producen entrecruzamientos ADN-proteína. Las roturas de doble hebra (DSB) son la lesión más peligrosa.

11.6.2 Mutágenos químicos

Tabla 20. Mutágenos químicos representativos: mecanismo y lesión generada.

Mutágeno	Ejemplo	Mecanismo	Lesión / Mutación
Alquilantes	Mostaza nitrogenada, cisplatino, temozolomida	Transfieren grupos alquilo a bases (N7-G, O^6-G)	Entrecruzamientos intrahebra, G:C→A:T
Intercalantes	Bromuro de etidio, acridinas	Insertan entre pares de bases, distorsionan la	Indels de +1/−1 nt por deslizamiento

		hélice	
Análogos de bases	5-bromouracilo (5-BU)	Se incorpora en lugar de timina; cambia pareamiento	Transición A:T→G:C
Agentes desaminantes	Nitrito de sodio, hidroxilamina	Desaminan C→U, A→hipoxantina	Transición C:G→T:A
HAP (hidrocarburos)	Benzo[a]pireno (tabaco)	Activado por CYP1A1 a epóxido; aducto a N2-G	Transversión G:C→T:A (firma NSCLC)
Aflatoxinas	Aflatoxina B_1 (hongos)	Epóxido activo; aducto a N7-G	G→T en TP53, codón 249 (hepatocarcinoma)

Fuente: Lewin et al. (2022) y Watson et al. (2014)

Nota. HAP = hidrocarburos aromáticos policíclicos; NSCLC = carcinoma pulmonar no microcítico.

11.6.3 Mutágenos biológicos: transposones y virus

Elementos transponibles activos: la inserción de LINE-1 o retrovirus endógenos en un exón puede inactivar el gen. Mutaciones de inserción de Alu han sido documentadas en *BRCA2* y en el gen de la coagulación *F8*. **Virus oncogénicos:** integración del VPH (E6/E7) cerca de *TERT* o *MYC*; inserción del VHB en *TP53* en hepatocarcinoma.

¿Sabías que. . . ?

El proyecto *COSMIC* (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) ha catalogado más de 6 millones de variantes somáticas en >40 000

tumores. La comparación de las firmas mutacionales (SBS — Single Base Substitution Signatures) permite identificar el mutágeno causante: SBS4 (tabaco) se caracteriza por C>A en contexto TCC; SBS7 (UV) muestra C>T en CpC; SBS22 (aristoloquiato) tiene A>T en ApT (Watson et al., 2014).

11.7 Sistemas de reparación del ADN y enfermedades asociadas

Los sistemas de reparación (introducidos en el capítulo 4) se describen aquí con mayor profundidad en el contexto de las enfermedades causadas por su déficit (Alberts et al., 2022; Lodish et al., 2021).

11.7.1 Reparación por escisión de bases (BER)

BER corrige lesiones de base únicas que no distorsionan la hélice: bases oxidadas (8oxoG), desaminadas (uracilo) y alquiladas. La glicosilasa específica (UNG para uracilo, OGG1 para 8-oxoG) elimina la base dañada, generando un sitio AP que es procesado por APE1, llenado por Pol β y ligado por XRCC1-Lig3. Mutaciones en *MUTYH* (glicosilasa de adenina opuesta a 8-oxoG) causan el síndrome de poliposis colorrectal asociado a MUTYH (MAP), autosómico recesivo (Nussbaum et al., 2016).

11.7.2 Reparación por escisión de nucleótidos (NER)

NER reconoce distorsiones de la hélice (dímeros UV, adductos voluminosos). Implica ∼30 proteínas en un proceso de:

1. Reconocimiento (XPC–RAD23B en GGR; ARN Pol II parada en TCR) 2. Apertura y verificación (TFIIH con helicasas XPB/XPD) 3.

Escisión oligonucleotídica de 25 nt a 30 nt (XPF-ERCC1/XPG) 4. Resíntesis (Pol *δ/ε*) y ligación

Déficit de NER: **Xeroderma pigmentoso** (XP-A a XP-G): sensibilidad extrema a UV y riesgo 1000× aumentado de cánceres de piel; **síndrome de Cockayne** (CSA/CSB): defecto específico de TCR, neurodegeneración y envejecimiento prematuro (Strachan & Read, 2019).

11.7.3 Reparación de bases no apareadas (MMR)

MMR corrige bases mal apareadas que escapan a la exonucleasa de la polimerasa. El complejo MutS*α* (MSH2–MSH6) reconoce el par erróneo; MutL*α* (MLH1–PMS2)

coordina la escisión y resíntesis de la hebra hija. La marca que distingue la hebra hija (a corregir) de la molde en eucariotas es el extremo libre generado en los fragmentos de Okazaki (Alberts et al., 2022).

Déficit: **Síndrome de Lynch** (HNPCC): mutaciones germinales en *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* o *PMS2*; inestabilidad de microsatélites (MSI-H); riesgo aumentado de CCR, endometrio, ovario. La **hipermetilación somática de *MLH1*** explica el 15 % de CCR esporádicos MSI-H (epigenética y mutaciones convergentes).

11.7.4 Reparación de roturas de doble hebra (DSB)

Las DSB son las lesiones más peligrosas. Se reparan por dos vías principales (Lodish et al., 2021):

Recombinación homóloga (HR): usa la cromátida hermana como molde; alta fidelidad; activa en fase S/G2. Requiere BRCA1, BRCA2, RAD51, RPA. Mutaciones germinales en *BRCA1/2*: riesgo acumulado de cáncer de mama 50 % a 80 % y ovario 15 % a 44 %.

Unión de extremos no homólogos (NHEJ): une directamente los extremos rotos; propenso a pequeñas inserciones/deleciones; activo en G0/G1. Requiere Ku70/Ku80, DNA-PKcs, Artemis, XRCC4-Lig4.

¡Importante!

Inhibidores de PARP (PARPi) y letalidad sintética: en tumores con déficit de HR (*BRCA1/2* mutados), las roturas de simple hebra son reparadas por PARP1/2. La inhibición de PARP con olaparib, niraparib o rucaparib genera DSB que no pueden ser reparados por HR, causando muerte celular selectiva del tumor. Este principio de *letalidad sintética* es el paradigma más exitoso de la oncología de precisión basada en mutaciones de reparación del ADN (Relling & Evans, 2015).

11.8 Nomenclatura HGVS e interpretación de variantes

11.8.1 Sistema HGVS

La nomenclatura de variantes de la HGVS (*Human Genome Variation Society*) estandariza la descripción de cambios en el ADN, ARN y proteína (Strachan & Read, 2019):

Nivel ADN: c. (codificante), g. (genómico), m. (mitocondrial). Ejemplo: c.1521_1523delCTT (deleción de 3 nt en posición 1521–1523).

Nivel ARN: r. Ejemplo: r.1521_1523del.

Nivel proteína: p. Ejemplo: p.Phe508del (deleción de fenilalanina en posición 508; mutación más frecuente de fibrosis quística).

Prefijo de referencia: obligatorio. Ejemplo: NM_000492.4(CFTR):c.1521_1523delCTT.

11.8.2 Clasificación de variantes ACMG/AMP (2015)

El American College of Medical Genetics clasifica las variantes en 5 categorías (Nussbaum et al., 2016):

1. **Patogénica (P):** evidencia sólida de causalidad de enfermedad.

2. **Probablemente patogénica (LP):** evidencia moderada-fuerte.

3. **Variante de significado incierto (VUS):** evidencia insuficiente o contradictoria.

4. **Probablemente benigna (LB):** evidencia moderada de benignidad.

5. **Benigna (B):** variante polimórfica sin efecto funcional conocido.

Los criterios combinan: frecuencia en bases de datos (gnomAD), predicciones *in silico* (SIFT, PolyPhen-2, CADD), datos funcionales, segregación familiar y evidencia de novo.

Aplicación para el Bioquímico Farmacéutico

El bioquímico farmacéutico y la farmacogenómica: muchas variantes «benignas» en la secuencia codificante son patogénicas en el contexto farmacogenómico. Por ejemplo, las variantes de *CYP2C9* (p.Ile359Leu, alelo *3) y *VKORC1* (c.−1639G>A) no causan enfermedad espontáneamente, pero determinan la dosis de warfarina. El BQF interpreta estas variantes según las guías CPIC (Clinical Pharmacogenomics Implementation Consortium) para ajustar dosis y prevenir hemorragias o fallo terapéutico (Relling & Evans, 2015; Weinshilboum & Wang, 2017).

11.9 Mutaciones somáticas en cáncer: del conductor al pasajero

Las células cancerosas acumulan mutaciones somáticas por dos razones: mayor tasa de lesiones (estrés oxidativo, oncogenes activos que fuerzan la replicación) y menor capacidad de reparación (déficit adquirido de MMR, NER o HR). La **carga mutacional tumoral** (TMB, *tumor mutational burden*) es el número de mutaciones somáticas por megabase de ADN codificante (Watson et al., 2014).

Mutaciones driver (conductoras): confieren ventaja selectiva al clon tumoral. Afectan oncogenes (*KRAS*, *BRAF*, *EGFR*) o genes supresores (*TP53*, *RB1*, *APC*).

Mutaciones passenger (pasajeras): sin valor selectivo; se acumulan junto con las drivers. Constituyen la mayoría de las variantes tumorales.

TMB alta (>10 mut/Mb): asociada a déficit de MMR (MSI-H) o a exposición a mutágenos. Predice respuesta a inmunoterapia con inhibidores de puntos de control (pembrolizumab, nivolumab), independientemente del origen histológico. El diagnóstico de MSI-H o TMB-H mediante panel NGS del tumor es requisito para prescribir estos agentes, y es función directa del laboratorio de biología molecular clínica en el que trabaja el BQF (Relling & Evans, 2015).

Caso Clínico

Caso clínico 1 — Carcinoma pulmonar EGFR-mutado y resistencia adquirida Presentación: Mujer no fumadora de 52 años, adenocarcinoma pulmonar estadio IV (metástasis óseas). NGS tumoral: *EGFR* p.Leu858Arg (c.2573T>G, exón 21) VAF 62 %; resto de variantes son VUS o pasajeras. TMB: 4,2 mut/Mb. **Análisis molecular de la variante:**

Clasificación ACMG: patogénica (criterios PS3, PM1, PM2, PP3 cumplidos). Efecto bioquímico: sustitución Leu→Arg en el dominio quinasa de EGFR; estabiliza la conformación activa, generando autofosforilación constitutiva independiente de EGF. Predicción de respuesta: sensible a erlotinib, gefitinib, osimertinib (inhibidores tirosina quinasa de EGFR, EGFR-TKI de 1.ª y 3.ª generación).

Evolución y resistencia: Después de 14 meses de erlotinib, reaparece la enfermedad. Nueva biopsia líquida (ctDNA en plasma): detección de *EGFR* p.Thr790Met (c.2369C>T, «guardián de puerta»), VAF 18 %.

Análisis: La mutación T790M es una mutación de resistencia adquirida. Sustituye Thr→Met en el sitio de unión del inhibidor, incrementando la afinidad por ATP del receptor y reduciendo la competencia del fármaco. Osimertinib (EGFR-TKI 3.ª gen, aprobado FDA 2017 en T790M+) tiene diseño covalente que supera este mecanismo de resistencia.

Preguntas de razonamiento:

1. ¿Por qué la mutación L858R es una mutación de ganancia de función y no de pérdida de función?

2. ¿Qué tipo de mutación es T790M según la nomenclatura HGVS y qué consecuencia tiene sobre la estructura del sitio de unión del fármaco?

3. ¿Por qué la biopsia líquida (ctDNA) es preferible a la rebiopsia de tejido para detectar mutaciones de resistencia emergente?

11.10 Concepto Clave

Integración del capítulo: Las mutaciones son el sustrato de la enfermedad genética y el cáncer. Su clasificación —por extensión, tipo molecular, origen y consecuencia funcional— proporciona el vocabulario para el diagnóstico molecular moderno. Los sistemas de reparación del ADN (BER, NER, MMR, HR, NHEJ) constituyen la primera línea de defensa; su déficit hereditario define síndromes de cáncer de alta penetrancia (Lynch, Xeroderma, BRCA). La nomenclatura HGVS y la clasificación ACMG/AMP son las herramientas estándar que el bioquímico farmacéutico usa para

interpretar informes de NGS y guiar decisiones terapéuticas como el uso de PARPi, EGFR-TKI o inmunoterapia basada en TMB/MSI.

11.11 Actividades de Consolidación

Actividad 1 — Interpretación de variantes con criterios ACMG

Objetivo: Clasificar tres variantes reportadas en un panel NGS hereditario de cáncer de mama/ovario usando criterios ACMG/AMP.

Instrucciones:

1. Variante 1: BRCA1 c.5266dupC (p.Gln1756fs). Encontrada en <0,001 % de gnomAD; reportada en 50 familias con cáncer de mama. Clasifíquela según criterios PVS1, PS4, PM2.

2. Variante 2: BRCA2 c.7471A>G (p.Ile2491Val). Predicción PolyPhen-2: benigna (0.02); SIFT: tolerada; MAF gnomAD: 0.003. No reportada en bases de enfermedades. Clasifíquela.

3. Variante 3: MSH2 c.1906G>C (p.Asp636His). Predicción PolyPhen-2: posiblemente dañina (0.78); CADD: 28. Reportada en 2 familias; sin datos funcionales. Clasifíquela.

4. Para la variante clasificada como VUS, proponga estudios funcionales o de segregación familiar que podrían reclasificarla.

Entregable: Tabla de clasificación ACMG con criterios aplicados, resultado y recomendación de seguimiento clínico.

Actividad 2 — Análisis de firmas mutacionales en COSMIC

Objetivo: Identificar la etiología del mutágeno a partir del patrón de sustituciones de base simple en un tumor hipotético.

Instrucciones:

1. Se proporciona un espectro de 100 variantes de un adenocarcinoma gástrico: 68 % C>T en contexto CpC/TpC; 12 % C>A; 8 % T>G; 12 % otras. Identifique las signaturas COSMIC dominantes (SBS1/SBS7/SBS4/SBS6).

2. Proponga la probable etiología mutacional (exposición ambiental, déficit de reparación o envejecimiento) y su relevancia clínica para el paciente.

3. Determine si el perfil sugiere MSI-H y qué test molecular de confirmación solicitaría.

Entregable: Informe de 300 palabras con identificación de firmas, etiología y propuesta diagnóstica.

11.12 Preguntas de Autoevaluación

A. Selección Múltiple

1. Una mutación *nonsense* en el codón 200 de un gen de 600 codones genera una proteína truncada. ¿Cuál mecanismo celular eliminaría preferentemente el ARNm mutante?

a) Reparación por escisión de bases (BER)

b) **Nonsense-mediated decay (NMD)**

c) Degradación por el proteasoma 26S

d) Silenciamiento por miARN

2. La firma mutacional SBS7 (C>T en CpC) es característica de tumores causados por:

a) Tabaquismo

b) **Exposición a radiación UV**

c) Déficit de MMR (MSI)

d) Aflatoxinas

3. La mutación *CFTR* p.Phe508del produce fibrosis quística. Por nomenclatura HGVS a nivel de ADN codificante, la misma mutación se escribe:

a) p.1523delTTT

b) g.117559593delCTT

c) **c.1521_1523delCTT**

d) r.1521_1523delcuu

4. ¿Cuál de los siguientes sistemas de reparación corrige específicamente los dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) inducidos por radiación UV?

a) BER (reparación por escisión de bases)

b) MMR (reparación de apareamientos erróneos)

c) **NER (reparación por escisión de nucleótidos)**

d) NHEJ (unión de extremos no homólogos)

5. Una mujer de 40 años porta la variante BRCA2 p.Gln1756Profs*74 (frameshift, clasificada patogénica). Su tumor de ovario es HR-deficiente. ¿Cuál fármaco tiene mayor probabilidad de respuesta dirigida por este hallazgo?

a) Tamoxifeno b) Erlotinib

c) Azacitidina

d) **Olaparib (inhibidor de PARP)**

6. La mutación *KRAS* p.Gly12Val es un ejemplo de:

a) Pérdida de función recesiva

b) Dominante negativo

c) **Ganancia de función dominante (GTPasa constitutivamente activa)**

d) Mutación de splicing con retención intrónica

7. La desaminación espontánea de 5-metilcitosina genera:

a) Uracilo; reparado eficientemente por UNG b) 8-oxoguanina; reparada por OGG1

c) **Timina; mutación CpG→TpG si no se repara antes de la replicación**

d) Hipoxantina; causa transición A:T→G:C

8. El síndrome de Lynch se produce por mutaciones germinales en genes de:

a) Reparación por recombinación homóloga (BRCA1/2, RAD51)

b) Reparación por escisión de nucleótidos (XPA–XPG)

c) Reparación por escisión de bases (MUTYH, OGG1)

d) **Reparación de apareamientos erróneos (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2)**

B. Verdadero o Falso

1. **Afirmación:** Las mutaciones sinónimas (silentes) nunca tienen consecuencias funcionales porque no cambian el aminoácido codificado.

Respuesta: **Falso.** Las mutaciones sinónimas pueden afectar la eficiencia de traducción (codones raros ralentizan el ribosoma, alterando el plegamiento cotraduccional), la estabilidad del ARNm o sitios de empalme crípticos. Un ejemplo documentado: *ABCB1* c.3435C>T (p.Ile1145Ile) altera la actividad funcional de la P-glicoproteína a pesar de no cambiar el aminoácido (Strachan & Read, 2019).

2. **Afirmación:** Las mutaciones de ganancia de función siempre producen enfermedades más graves que las mutaciones de pérdida de función, porque la proteína mutante tiene actividad añadida.

Respuesta: **Falso.** La gravedad depende del contexto biológico. Algunas LoF son letales en hemicigosis (ej., *F8* en hemofilia A grave) mientras que muchas GoF son letales en heterocigosis si afectan genes esenciales. La distinción más relevante clínicamente no es la gravedad sino la implicación terapéutica: GoF puede requerir inhibición del producto mutante; LoF puede beneficiarse de terapia sustitutiva o de corrección génica (Nussbaum et al., 2016).

3. **Afirmación:** Los inhibidores de PARP (PARPi) son eficaces en todos los tumores con mutaciones en genes de reparación del ADN, sin importar el mecanismo de reparación deficiente.

Respuesta: **Falso.** Los PARPi se basan en el principio de letalidad sintética con la vía HR. Son eficaces principalmente en tumores HR-deficientes (*BRCA1/2* mutados, mutaciones en *RAD51C/D*, *PALB2*, etc.). Tumores con déficit de MMR (Lynch) o de NHEJ no responden específicamente a PARPi; se benefician más de inmunoterapia (MSI-H) o de radiación (NHEJ) (Relling & Evans, 2015).

C. Análisis de Casos

1. **Caso:** Un hombre de 45 años con historia familiar de cáncer colorrectal precoz (madre: CCR a 38 años; hermano: cáncer de endometrio a 41 años) es evaluado en consulta de consejo genético. El estudio de inmunohistoquímica del tumor del probando muestra

pérdida de expresión de MLH1 y PMS2. Secuenciación del gen *MLH1* en DNA germinal: se detecta la variante MLH1 c.677G>T (p.Arg226Leu); en bases de datos: reportada en 8 familias Lynch; PolyPhen-2: probablemente dañina (0.98); segregación: presente en 3/3 familiares afectados.

Preguntas:

a) Clasifique la variante según criterios ACMG, listando los criterios aplicados.

b) Explique por qué la pérdida de expresión de MLH1 **y** PMS2 (pero no MSH2 ni MSH6) es consistente con una mutación en *MLH1*.

c) Proponga el algoritmo de seguimiento clínico para los familiares de primer grado del paciente.

2. **Caso:** En un laboratorio de toxicología, se analiza el ADN de células hepáticas de trabajadores expuestos a aflatoxina B1 (AFB1). Mediante secuenciación, se detecta elevada frecuencia de la variante *TP53* c.747G>T (p.Arg249Ser) en el tejido hepático (VAF 3 % en células no tumorales).

Preguntas:

a) Identifique el tipo de transición/transversión de la variante c.747G>T y relacione el mecanismo de acción de la AFB1 con la generación de esta mutación específica.

b) ¿Por qué esta variante es considerada *driver* y no *passenger* en el hepatocarcinoma?

c) Proponga marcadores biológicos adicionales (epigenéticos o moleculares) que podrían utilizarse en la vigilancia de los trabajadores expuestos.

11.13 Glosario

ACMG/AMP Marco de clasificación de variantes del American College of Medical Genetics; categoriza las variantes en 5 clases (patogénica, LP, VUS, LB, benigna) usando criterios estandarizados de evidencia molecular y clínica.

Carga mutacional tumoral (TMB) Número de mutaciones somáticas por megabase en el exoma tumoral. Valores altos (>10 mut/Mb) predicen respuesta a inmunoterapia con inhibidores de puntos de control.

Dímero de ciclobutano pirimidina (CPD) Fotoproducto formado por la irradiación UV entre dos pirimidinas adyacentes; bloquea la ADN polimerasa y es reparado por NER.

Frameshift Mutación que desplaza el marco de lectura del ARNm por inserción o deleción de un número de nucleótidos no múltiplo de 3; genera una secuencia de aminoácidos alterada a partir del sitio de la mutación y suele producir un codón de parada prematuro.

Firma mutacional (SBS) Patrón característico de sustituciones de base simple en el genoma de un tumor; refleja la exposición a mutágenos específicos o déficits de reparación. Catalogado en el proyecto COSMIC.

Ganancia de función (GoF) Tipo de mutación en que la proteína mutante adquiere una actividad nueva o exacerbada; generalmente de herencia dominante. Ejemplo: *KRAS* G12V.

HGVS Human Genome Variation Society; organismo que establece la nomenclatura estándar para describir variantes genéticas en niveles de ADN (c., g.), ARN (r.) y proteína (p.).

Inestabilidad de microsatélites (MSI) Alteraciones en la longitud de repeticiones de STR causadas por déficit de MMR; detectada por PCR o NGS; marcador diagnóstico del síndrome de Lynch y predictor de respuesta a inmunoterapia.

Letalidad sintética Combinación de dos alteraciones genéticas o farmacológicas que, individualmente, permiten la supervivencia celular pero, juntas, causan muerte celular; base del uso de PARPi en tumores BRCA-mutados.

Missense Mutación puntual que sustituye un aminoácido por otro distinto en la proteína; puede ser deletérea, neutra o activadora dependiendo del contexto estructural.

Mutación driver Variante somática que confiere ventaja selectiva al clon tumoral y es causalmente implicada en el desarrollo del cáncer. Contrasta con las mutaciones pasajeras.

Nonsense-mediated decay (NMD) Mecanismo de vigilancia del ARNm que degrada transcritos con codones de parada prematuros a más de 50–55 nt antes de la última unión exón-exón, previniendo la síntesis de proteínas truncadas dominantes negativas.

Pérdida de función (LoF) Mutación que reduce o elimina la actividad de la proteína codificada; si un solo alelo es suficiente para enfermedad (haploinsuficiencia), el patrón es dominante; si se requieren ambos alelos mutados, es recesivo.

Sitio AP (*abasic site*) Posición en el ADN donde se ha perdido la base nitrogenada por depurinación o depirimidinación; bloquea la ADN polimerasa y es sustrato de reparación por BER.

VUS (variante de significado incierto) Variante genética para la que la evidencia disponible es insuficiente para clasificarla como patogénica o benigna; requiere estudios adicionales funcionales o de segregación familiar.

11.14 Resumen

Las mutaciones son alteraciones permanentes en la secuencia del ADN que pueden surgir espontáneamente o ser inducidas por agentes externos. Se clasifican por su extensión (puntuales SNV, indels, CNV, cromosómicas), por su efecto sobre la proteína (sinónimas, missense, nonsense, frameshift, splicing, expansiones de repeticiones) y por su consecuencia funcional (pérdida de función, ganancia de función, dominante negativo). Las mutaciones espontáneas más frecuentes en el genoma humano son las transiciones CpG→TpG derivadas de la desaminación de 5-metilcitosinas, las transversiones G:C→T:A por 8-oxoG y las transiciones C:G→T:A por desaminación de citosina; el deslizamiento de la ADN polimerasa en secuencias repetidas genera los indels que causan cambios de marco.

Los mutágenos físicos (UV, radiación ionizante) y químicos (alquilantes, intercalantes, HAP, aflatoxinas) incrementan la tasa basal de mutaciones por mecanismos específicos, dejando «firmas mutacionales» características que pueden ser identificadas por NGS. Los sistemas de reparación —BER (bases dañadas aisladas), NER (distorsiones de hélice), MMR (apareamientos erróneos), HR y NHEJ (roturas de doble hebra)— minimizan la acumulación de mutaciones; su déficit hereditario define síndromes de predisposición al cáncer con alta penetrancia y relevancia clínica directa: Xeroderma pigmentoso

(NER), síndrome de Lynch (MMR), síndrome BRCA (HR-deficiencia), síndrome MAP (BER-MUTYH).

La nomenclatura HGVS estandariza la descripción de variantes en niveles de ADN, ARN y proteína; la clasificación ACMG/AMP las estratifica en 5 categorías de patogenicidad. En la práctica del bioquímico farmacéutico, este marco se aplica para interpretar informes de NGS en oncohematología (LMA, NSCLC, CCR) y en farmacogenómica (CYP450, VKORC1), guiando decisiones terapéuticas de precisión: uso de PARPi en tumores HR-deficientes, EGFR-TKI en NSCLC EGFR-mutado, o inmunoterapia en tumores MSI-H/TMB-alto.

CAPÍTULO XII

12 BASES MOLECULARES DE LAS ENFERMEDADES HEREDITARIAS Y ADQUIRIDAS

El capítulo 11 proporcionó el vocabulario para describir y clasificar las mutaciones. Este capítulo aplica ese conocimiento para comprender cómo alteraciones específicas en el ADN se traducen en las manifestaciones clínicas de enfermedades concretas, tanto hereditarias como adquiridas. El bioquímico farmacéutico que entiende la base molecular de una enfermedad puede interpretar las pruebas diagnósticas, anticipar las consecuencias de una variante patogénica y participar activamente en el diseño de estrategias terapéuticas dirigidas al defecto primario.

12.1 Introducción

Las enfermedades con base genética se han clasificado clásicamente en cuatro grandes grupos: cromosómicas (capítulo 7), monogénicas (enfermedades mendelianas), multifactoriales y mitocondriales. A estas se suman las enfermedades somáticas adquiridas —fundamentalmente el cáncer— en las que mutaciones acumuladas en células no germinales alteran el control del ciclo celular y la muerte programada (Nussbaum et al., 2016).

La comprensión molecular de estas enfermedades ha seguido un camino que parte del fenotipo clínico hacia la identificación del gen causante (*forward genetics*) o desde una variante genómica hacia sus consecuencias funcionales (*reverse genetics*). La era de la

secuenciación masiva ha democratizado este proceso: hoy es posible identificar la causa de una enfermedad rara en días mediante exoma completo (Strachan & Read, 2019).

Para el bioquímico farmacéutico, esta comprensión es instrumental: la mayoría de las terapias de precisión aprobadas en la última década tienen como diana la proteína defectuosa o la vía afectada por la mutación causante. La modulación de CFTR en fibrosis quística, la terapia de reposición enzimática en esfingolipidosis, los correctores de plegamiento en α1-antitripsina y los inhibidores de quinasas oncogénicas son todos ejemplos de farmacología molecular aplicada directamente al defecto genético (Harvey, 2019).

12.2 Objetivos de Aprendizaje

Describir la base molecular de las enfermedades monogénicas más prevalentes (fibrosis quística, fenilcetonuria, hemoglobinopatías, distrofia muscular de Duchenne) relacionando la mutación con el defecto bioquímico y el fenotipo.

Explicar los mecanismos moleculares de predisposición hereditaria al cáncer, incluyendo el modelo de Knudson y los genes de predisposición de alta penetrancia.

Analizar el papel de las mutaciones somáticas en oncogenes y genes supresores de tumores en la progresión maligna, usando la secuencia adenoma-carcinoma del CCR como modelo integrador.

Relacionar el conocimiento de la base molecular con las estrategias de diagnóstico molecular y terapia de precisión para cada enfermedad.

Aplicar el concepto de farmacogenómica para predecir la respuesta individual a fármacos en enfermedades hereditarias y oncológicas.

Preguntas de Enfoque

1. ¿Por qué la misma mutación en un gen puede producir fenotipos clínicos muy diferentes en distintos pacientes (heterogeneidad fenotípica)?

2. ¿Cuál es la diferencia entre una enfermedad de ganancia de función como la enfermedad de Huntington y una de pérdida de función como la fibrosis quística, en términos de estrategia terapéutica?

3. ¿Por qué se requieren «dos golpes» para la transformación maligna en los retinoblastomas hereditarios y esporádicos?

4. ¿Cómo puede la misma vía de señalización (p.ej., RAS/MAPK) ser activada por mutaciones en genes diferentes, originando síndromes clínicamente similares?

5. ¿Qué información adicional necesita un bioquímico farmacéutico, más allá de la variante causal, para recomendar un tratamiento personalizado?

12.3 Enfermedades monogénicas de pérdida de función

Las enfermedades autosómicas recesivas y ligadas al X son el arquetipo de las enfermedades de pérdida de función: se requieren mutaciones en los dos alelos (o en el único alelo funcional en hemigotos) para suprimir la actividad proteica por debajo del umbral funcional (Nussbaum et al., 2016).

12.3.1 Fibrosis quística: el paradigma de la terapia dirigida al defecto molecular

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva grave más frecuente en poblaciones caucásicas (1:2500 RN), causada por mutaciones en *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) en 7q31.2 (Harvey, 2019). CFTR es un canal

de cloruro regulado por AMPc (clase ABC transportador) expresado en epitelios de pulmón, páncreas, intestino y aparato reproductor.

Clases de mutaciones de CFTR:

Clase I (síntesis nula): mutaciones nonsense, frameshift, splicing graves; no se produce proteína. Ejemplo: W1282X (frecuente en judíos askenazíes).

Clase II (defecto de plegamiento y tráfico): la proteína se sintetiza pero no llega a la membrana plasmática; es retenida en el RE y degradada por ERAD. Ejemplo: **p.Phe508del (clase II,** 70 % **de todos los alelos FQ)**: ausencia de fenilalanina en el NBD1 impide el plegamiento correcto de CFTR.

Clase III (defecto de activación/apertura): la proteína llega a la membrana pero no responde a AMPc. Ejemplo: G551D. **Clases IV–VI:** conductancia reducida, splicing alternativo parcial, inestabilidad en membrana.

Moduladores de CFTR: Los avances más relevantes en FQ son los moduladores farmacológicos que atacan el defecto primario de CFTR (Harvey, 2019; Relling & Evans, 2015):

Potenciadores (clase III): ivacaftor (VX-770) →aumenta la probabilidad de apertura del canal en G551D+; aprobado FDA 2012.

Correctores (clase II): lumacaftor (VX-809), tezacaftor (VX-661) →chaperona farmacológica que facilita el plegamiento de p.Phe508del y su tráfico a la membrana.

Triple terapia: elexacaftor + tezacaftor + ivacaftor (ETI, Trikafta) →para p.Phe508del homocigoto y heterocigoto; eficacia en >90 % de los pacientes FQ; aprobado FDA 2019.

Aplicación para el Bioquímico Farmacéutico

Genotipado de CFTR en el laboratorio de BQF: el panel estándar cubre 23 variantes CFTR más frecuentes (ACMG 2004); para portadores o diagnóstico de confirmación se usa secuenciación completa + análisis de CNV (MLPA) por el laboratorio clínico. El resultado del genotipo determina el modulador elegible: ivacaftor solo para G551D; ETI para Phe508del. El BQF también monitoriza concentraciones plasmáticas de ivacaftor (terapéutica: 500 ng⁄mL a 1500 ng⁄mL) mediante LC-MS/MS en el laboratorio de farmacología clínica (Relling & Evans, 2015).

12.3.2 Fenilcetonuria: bloqueo metabólico por déficit enzimático

La fenilcetonuria (PKU) es causada por mutaciones en *PAH* (fenilalanina hidroxilasa, 12q23), que convierte fenilalanina (Phe) en tirosina usando BH4 (tetrahidrobiopterina) como cofactor (Nussbaum et al., 2016). La acumulación de Phe inhibe el transporte de otros aminoácidos neutros grandes al SNC y altera la síntesis de neurotransmisores.

PKU clásica: actividad PAH <1 %; Phe plasmática ≥1200 µmol/L sin tratamiento.

PKU leve / hiperfenilalaninemia: residual PAH 1 % a 35 %; Phe 360 µmol/L a 1200 µmol/L.

Tratamiento: dieta restringida en Phe + fórmulas especiales; **sapropterina** (BH4, Kuvan): chaperona farmacológica que estabiliza mutantes de PAH respondedores (~30 % de pacientes); **pegilado fenilalanina amoniaco liasa (pegvaliasa)**: enzima sustitutiva que degrada Phe independientemente de PAH; aprobado FDA 2018 para adultos con PKU (Harvey, 2019).

12.3.3 Hemoglobinopatías: talasemias y HbS

Las hemoglobinopatías son las enfermedades monogénicas más prevalentes en el mundo (>300 000 nacidos afectados/año). Se dividen en estructurales (hemoglobina variante) y talasemias (déficit cuantitativo de cadenas de globina) (Strachan & Read, 2019):

Drepanocitosis (HbS): p.Glu6Val en la cadena *β*-globina (*HBB*); sustitución de un residuo hidrofílico (Glu) por uno hidrofóbico (Val) expone una superficie de polimerización. En condiciones de baja PO2, HbS polimeriza formando filamentos que deforman el eritrocito en drepanocito. ***β*-talasemia mayor:** mutaciones en *HBB* (promotor, splicing, nonsense) reducen o eliminan la cadena *β*; el exceso de cadenas *α* precipita dentro del eritrocito, causando hemólisis intravascular grave; requiere transfusiones o trasplante de médula ósea. ***α*-talasemia:** deleciones del locus *HBA* (16p13.3); la gravedad depende del número de alelos delecionados (1–4).

Terapias emergentes: hidroxiurea (induce HbF, compite con HbS); **luspatercept** (promotor de eritropoyesis tardía); **terapia génica con vectores lentivirales** que introducen *β*-globina funcional o una globina antifalciformante (*betibeglogene autotemcel*, aprobado FDA 2022) (Harvey, 2019).

12.4 Enfermedades de almacenamiento lisosomal: déficit de enzimas catabólicas

Las enfermedades de almacenamiento lisosomal (EAL) resultan del déficit de enzimas hidrolíticas en el lisosoma, con acumulación progresiva de sustratos no degradados en los tejidos (Karp et al., 2019). Constituyen más de 50 entidades clínicas.

Tabla 21. Enfermedades de almacenamiento lisosomal: enzima deficiente, sustrato acumulado y terapia disponible.

Enfermedad	Enzima deficiente	Sustrato acumulado	Terapia aprobada
Gaucher tipo 1	β-glucocerebrosidasa (GBA)	Glucosilceramida	TRE: imiglucerasa, velaglucerasa; reducción de sustrato: miglustat, eliglustat
Pompe (GSD II)	α-glucosidasa ácida (GAA)	Glucógeno	TRE: alglucosidasa alfa; avalglucosidasa alfa (2021)
Fabry	α-galactosidasa A (GLA)	Globotriaosil-ceramida	TRE: agalsidasa alfa/beta; chaperona: migalastat (para mutaciones sensibles)
Niemann-Pick A/B	Esfingomielinasa ácida (SMPD1)	Esfingomielina	Olipudase alfa (2022, tipo B)
Krabbe	Galactocerebrosidasa (GALC)	Galactosilceramida	No hay TRE; TPH en etapa presintomática
MPS I (Hurler)	α-L-iduronidasa (IDUA)	Dermatán/heparán sulfato	TRE: laronidasa; TPH

Fuente: Harvey (2019) y Nussbaum et al. (2016).

Nota. TRE = terapia de reposición enzimática; TPH = trasplante de progenitores hematopoyéticos; GSD = glucogenosis.

Concepto Clave

Las terapias de reposición enzimática administran la proteína recombinante purificada que ingresa al lisosoma vía receptor de manosa-6-fosfato (M6P). Su eficacia depende de que el receptor M6P esté intacto en los lisosomas del paciente. Las chaperonas farmacológicas (migalastat en Fabry) estabilizan el sitio activo de la enzima mutante con plegamiento alterado, facilitando su tráfico desde el RE al lisosoma: son efectivas solo en variantes «sensibles» —las que retienen algo de actividad residual.

12.5 Enfermedades de ganancia de función y mecanismos dominantes

12.5.1 Enfermedad de Huntington: expansión tóxica de poliglutaminas

La enfermedad de Huntington (EH) es causada por la expansión del triplete CAG en el exón 1 de *HTT* (4p16.3): >36 repeticiones producen EH; 36 a 39 repeticiones muestran penetrancia reducida (Strachan & Read, 2019). Cada CAG adicional codifica una glutamina (poliQ): tramos largos de poliQ forman agregados nucleares insolublesque secuestran factores de transcripción, chaperonas y proteínas del UPS, llevando a disfunción neuronal y muerte de neuronas estriatales.

La EH muestra **anticipación genética** —las repeticiones se expanden durante la espermatogénesis (transmisión paterna); la expansión es progresiva en generaciones sucesivas. El mecanismo de toxicidad es exclusivamente de **ganancia de función** de la huntingtina mutante: el alelo silvestre produce una proteína normal que no compensará.

Implicaciones terapéuticas: el objetivo es reducir la expresión de la huntingtina mutante. Las estrategias incluyen:

ASO (oligonucleótidos antisentido): tominersen (en desarrollo); degrada el ARNm de *HTT* mutante en LCR. **Silenciamiento con AAV-RNAi:** vectores adeno-asociados que entregan shRNA dirigido a *HTT* al estriado.

12.5.2 Rasopatías: activación constitutiva del eje RAS/MAPK

Las rasopatías son un grupo de síndromes causados por mutaciones de ganancia de función en componentes de la vía RAS/MAPK: *HRAS* (síndrome de Costello), *KRAS* (síndrome cardiofaciocutáneo), *PTPN11* (síndrome de Noonan, 50 %) (Nussbaum et al.,

2016). La señalización constitutiva de MAPK perturba el crecimiento, la diferenciación cardíaca, la función gonadal y el desarrollo cognitivo de manera pleitrópica.

El mismo eje RAS/MAPK es activado por mutaciones somáticas en ~30 % de todos los cánceres humanos (*KRAS* G12V/G12D/G12C), lo que ilustra la convergencia de enfermedad hereditaria y oncología molecular en la misma vía de señalización.

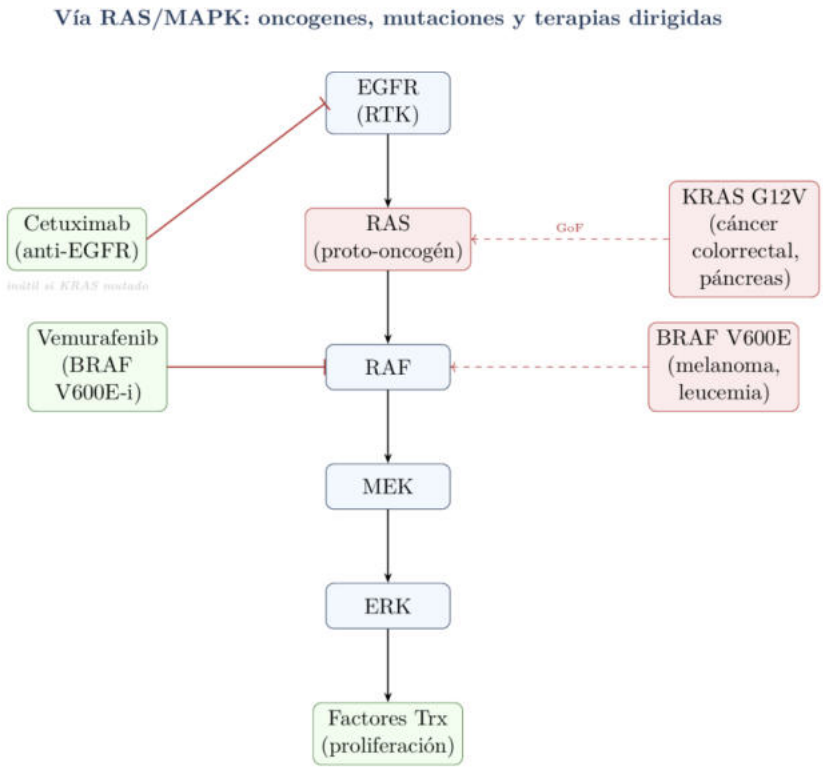


Figura 31. Vía de señalización RAS/MAPK con puntos de mutación oncogénica frecuentes y fármacos dirigidos.

Las mutaciones de ganancia de función en *KRAS* y *BRAF* activan constitutivamente la cascada proliferativa. La eficacia del cetuximab (anti-EGFR) requiere *KRAS* silvestre aguas abajo; vemurafenib bloquea selectivamente BRAF V600E. Elaboración propia basada en Lodish et al. (2021) y Watson et al. (2014).

12.6 Oncogénesis: modelo de dos golpes, oncogenes y supresores de tumores

12.6.1 Hipótesis de Knudson y el modelo de dos golpes

Knudson Jr. (1971) observó que el retinoblastoma hereditario (bilateral, inicio temprano) ocurría con un solo evento somático adicional, mientras que la forma esporádica (unilateral, inicio tardío) requería dos eventos independientes en la misma célula. Esta observación cristalizó en la hipótesis de los «dos golpes»:

1. **Primer golpe:** mutación en un alelo de *RB1* (heredada en la forma familiar; somática en la esporádica).

2. **Segundo golpe:** inactivación del alelo restante por mutación somática, deleción o epigenética (metilación de promotor) →pérdida de heterocigosidad (LOH).

Este modelo aplica a todos los genes supresores de tumores recesivos: *TP53*, *BRCA1/2*, *APC*, *VHL*, *MLH1*.

12.6.2 Proto-oncogenes y oncogenes

Los proto-oncogenes codifican proteínas que promueven el crecimiento normal (RTK, GTPasas, factores de transcripción). Una sola mutación activadora (dominante) en un alelo puede convertirlos en oncogenes (Lewin et al., 2022):

Tabla 22. Principales oncogenes, tipo de mutación activadora y tumores asociados.

Gen	Proteína / función	Mecanismo de activación	Tumor
KRAS	GTPasa	Missense G12/G13/Q61 (GoF)	CCR, adenocarcinoma de páncreas, NSCLC
EGFR	RTK receptor EGF	Deleción exón 19, L858R (GoF)	NSCLC adenocarcinoma
ERBB2 (HER2)	RTK	Amplificación génica	Mama, gástrico
BCR-ABL1	Tirosina quinasa constitutiva	Translocación t(9;22)	LMC, LLA-Ph+
MYC	Factor de transcripción	Translocación t(8;14), amplificación	Linfoma de Burkitt, neuroblastoma
BRAF	Serina/treonina quinasa	Missense V600E (GoF)	Melanoma, cáncer tiroideo

Fuente: Watson et al. (2014) y Lodish et al. (2021).

Nota. RTK = tirosina quinasa receptora; LMC = leucemia mieloide crónica; LLA = leucemia linfoblástica aguda.

12.6.3 Secuencia adenoma-carcinoma: un modelo integrador de oncogénesis

La progresión del adenoma tubular colorrectal al carcinoma invasivo requiere la acumulación secuencial de mutaciones en al menos 4–5 genes durante 10–15 años (Watson et al., 2014). Este modelo, propuesto por Vogelstein, es el paradigma de la oncogénesis como proceso evolutivo de múltiples pasos:

1. **Iniciación:** pérdida de *APC* (Wnt constitutivo) →mucosa normal →hiperproliferación.

2. **Promoción temprana:** activación de *KRAS* G12D →adenoma temprano de bajo grado.

3. **Progresión:** pérdida de *SMAD4/SMAD2* (TGF-*β* no suprime) →adenoma tardío de alto grado.

4. **Conversión maligna:** pérdida de *TP53* (guardián del genoma eliminado) → carcinoma *in situ*.

5. **Invasión y metástasis:** activación de metaloproteasas, pérdida de E-cadherina (epitelial-mesenquimal) →carcinoma invasivo.

¿Sabías que. . . ?

La acumulación de mutaciones en cáncer no es completamente aleatoria: existe un orden preferencial (*driver*) en el que ciertas mutaciones deben ocurrir antes que otras para ser seleccionadas. En el CCR, la mutación de *APC* es casi siempre la primera (*gate keeper*); *TP53* es casi siempre la última antes de la transición a carcinoma invasivo (Watson et al., 2014).

12.7 Enfermedades multifactoriales: interacción genambiente

Las enfermedades multifactoriales (cardiovasculares, diabetes tipo 2, esquizofrenia, asma, hipertensión) no siguen patrones mendelianos simples: resultan de la contribución aditiva de múltiples variantes comunes de efecto pequeño (*common disease, common variant*

hypothesis) más factores ambientales y epigenéticos (Strachan & Read, 2019).

GWAS (Genome-Wide Association Studies): los estudios de asociación genómica han identificado miles de loci de susceptibilidad para enfermedades comunes. Cada variante aumenta el riesgo de manera modesta (OR 1.1–1.5). Su utilidad clínica aumenta cuando se combinan en **puntuaciones de riesgo poligénico (PRS)**, que integran el efecto de cientos o miles de variantes en una sola métrica de riesgo individual (Nussbaum et al., 2016).

Farmacogenómica de enfermedades multifactoriales: muchas variantes comunes afectan la respuesta a fármacos de uso frecuente (estatinas, antihipertensivos, anticoagulantes), creando oportunidades para la personalización del tratamiento. El bioquímico farmacéutico participa en la implementación de paneles farmacogenómicos clínicos que guían la prescripción basándose en el genotipo del paciente (Relling & Evans, 2015; Weinshilboum & Wang, 2017).

12.8 Distrofias musculares: modelos de déficit estructural y terapia génica

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es causada por mutaciones de pérdida de función en *DMD* (Xp21), el gen más grande del genoma humano (2,4 Mb, 79 exones) (Strachan & Read, 2019). La distrofina ancla el citoesqueleto de actina a la matriz extracelular a través del complejo distrofina-glucoproteína; su ausencia fragiliza la membrana muscular, generando lisis por estrés mecánico.

Estrategias terapéuticas:

Salto de exón (*exon skipping*): oligonucleótidos antisentido (eteplirsen, viltolarsen, casimersen) dirigen al espliceosoma para saltar exones con mutaciones

frameshift, restaurando el marco de lectura y produciendo una distrofina truncada (similar a Becker). Aprobados FDA 2016–2021 para mutaciones elegibles.

Terapia con stop codon read-through: ataluren (para mutaciones nonsense): permite al ribosoma ignorar el codón de parada prematuro. **Micro-distrofina con AAV:** vectores rAAV9 que llevan una versión minidistrofina (SRP-9001, delandistrogene moxeparvovec; FDA 2023).

Edición génica CRISPR-Cas9: salto de exón permanente mediante edición de sitios de splicing; en fase preclínica/ensayo clínico.

¡Importante!

Terapias de salto de exón y la importancia del genotipo exacto: la elegibilidad para eteplirsen depende de que la mutación del paciente sea corregible saltando el exón 51 (aplica al 13 % de los pacientes DMD). El laboratorio de biología molecular debe confirmar el genotipo exacto —tipo de mutación y exones involucrados— mediante MLPA y secuenciación, antes de que el clínico prescriba estas terapias de alto costo. Aquí el BQF es el eslabón crítico entre el diagnóstico genético y la selección terapéutica (Harvey, 2019).

Caso Clínico

Caso clínico 1 — Niño con fenilcetonuria y ajuste terapéutico
Presentación: Varón de 8 años con diagnóstico de PKU clásica por cribado neonatal positivo a las 48 h de vida (Phe 1850 µmol/L). Iniciado en dieta baja en fenilalanina desde el período neonatal; desarrollo psicomotor normal. Última revisión: Phe plasmática 480 µmol/L (objetivo 120 µmol/L a 360 µmol/L para su edad). **Genotipo:** *PAH* c.1222C>T (p.Arg408Trp) / c.842C>T (p.Pro281Leu), compound heterocigoto. p.Arg408Trp: clasificada patogénica, asociada a PKU clásica severa con actividad PAH ≈0 %. p.Pro281Leu: clasificada patogénica, actividad residual PAH 5 % a 10 % según estudios funcionales.

Decisión terapéutica: El alelo Pro281Leu tiene actividad PAH residual. Test de carga con BH4 (20 mg kg^(−)¹ oral): a las 24 h, Phe cae a 210 µmol/L (reducción >30 %) →respondedor a sapropterina.

Plan: iniciar sapropterina 10 mg kg^(−)¹ d^(−)¹ + liberalización progresiva de la dieta; monitorización de Phe plasmática mensual.

Preguntas de razonamiento:

1. Explique por qué este paciente compound heterocigoto puede responder a la sapropterina a pesar de tener el alelo Arg408Trp nulo.

2. ¿Cuál es el mecanismo bioquímico por el que la sapropterina (tetrahidrobiopterina) incrementa la actividad de la PAH mutante?

3. ¿Cómo monitoriza el laboratorio de BQF la respuesta al tratamiento combinado dieta+sapropterina a largo plazo?

Concepto Clave

Unificación del capítulo: Las enfermedades hereditarias y adquiridas comparten el mismo sustrato molecular —alteraciones en la secuencia o expresión del ADN— pero difieren en el nivel de la célula afectada (germinal vs. somática) y en el número de eventos necesarios para producir fenotipo. La comprensión del mecanismo molecular del defecto (déficit enzimático, proteína estructural ausente, señalización constitutiva) determina directamente la estrategia terapéutica: reposición enzimática, chaperona farmacológica, terapia génica, inhibidor de quinasa, o inmunoterapia.

12.9 Actividades de Consolidación

Actividad 1 — Análisis de la vía molecular en fibrosis quística

Objetivo: Relacionar la clase de mutación CFTR con el modulador farmacológico adecuado, aplicando el razonamiento molecular al caso clínico.

Instrucciones:

1. Para cada uno de los siguientes genotipos CFTR, identifique la clase de mutación y el tratamiento modulador indicado (si existe):

a) p.Phe508del/p.Phe508del;

b) p.Gly551Asp/p.Phe508del;

c) p.Trp1282Ter/p.Trp1282Ter;

d) p.Arg117His/p.Phe508del.

2. Explique por qué el tratamiento con ETI (elexacaftor+tezacaftor+ ivacaftor) es efectivo en el genotipo a) pero no en el genotipo c).

3. Proponga qué tecnología de terapia génica podría beneficiar al genotipo c) en el futuro cercano.

Entregable: Tabla de genotipos/clase/tratamiento + párrafo de justificación molecular.

Actividad 2 — Construcción del perfil de riesgo oncológico

Objetivo: Aplicar el modelo de dos golpes y la secuencia adenoma-carcinoma para evaluar el riesgo de CCR en una familia con síndrome de Lynch.

Instrucciones:

1. Reconstruir el árbol genealógico de 3 generaciones con los datos clínicos proporcionados: abuela: CCR a 45 años; madre: cáncer de endometrio a 50 años; paciente (35 años): portador de variante *MLH1* p.Arg226Leu (patogénica).

2. Calcular el riesgo acumulado de CCR para el paciente sin y con vigilancia endoscópica (colonoscopia cada 1–2 años).

3. Identificar los «dos golpes» moleculares necesarios para que el paciente desarrolle CCR y proponer biomarcadores tumorales que alertarían de la progresión.

Entregable: Árbol genealógico anotado, tabla de riesgos acumulados y propuesta de seguimiento con justificación molecular.

12.10 Preguntas de Autoevaluación

A. Selección Múltiple

1. La mutación *CFTR* p.Phe508del pertenece a la clase II porque:

a) Impide la síntesis de la proteína CFTR

b) Bloquea la activación del canal por AMPc

c) **La proteína se produce pero no se pliega correctamente y es retenida en el RE por ERAD**

d) Altera el sitio de empalme del exón 11

2. El principio de «dos golpes» de Knudson aplica a los genes supresores de tumores porque:

a) Son dominantes; basta con un alelo mutado para la pérdida de función b) Solo se expresan en tejidos tumorales

c) **Son recesivos a nivel celular: se requiere la inactivación de ambos alelos para perder la función supresora**

d) Requieren mutaciones en tándem en el mismo exón

3. Un niño con DMD tiene la mutación DMD c.4233_4249del en el exón 44 (frameshift). El fármaco eteplirsen actúa mediante:

a) Reposición de distrofina recombinante intravenosa

b) Silenciamiento permanente del gen mutante por CRISPR

c) **Salto del exón 51 con oligonucleótido antisentido, restaurando el marco de lectura y produciendo distrofina truncada funcional**

d) Inhibición del proteasoma para prevenir la degradación de distrofina mutante

4. La acumulación de glucosilceramida en la enfermedad de Gaucher se debe a:

a) Exceso de síntesis de glucosilceramida por activación del oncogén *GBA*

b) **Déficit de la enzima lisosomal *β*-glucocerebrosidasa, que no puede degradar el sustrato**

c) Déficit del receptor de manosa-6-fosfato, que impide la entrada de la enzima al lisosoma

d) Mutación en el gen de ceramidasa que bloquea la vía alternativa de degradación

5. En el melanoma, la mutación *BRAF* V600E es un blanco terapéutico porque:

a) Es una mutación de pérdida de función que impide la diferenciación del melanocito

b) Produce una proteína truncada que activa NF-κB

c) **Genera una quinasa de serina/treonina constitutivamente activa que activa la vía MAPK independientemente de RAS**

d) Es una translocación cromosómica que produce una proteína de fusión con actividad tirosina quinasa nueva

6. El retinoblastoma hereditario se manifiesta de forma bilateral y en edades más tempranas que el esporádico porque:

a) Las mutaciones germinales de *RB1* son más deletéreas que las somáticas

b) **El primer golpe ya está presente en todas las células desde el nacimiento; solo se necesita un evento somático adicional en cualquier célula retiniana**

c) Los pacientes hereditarios tienen mayor carga mutacional tumoral (TMB) d) El gen *RB1* tiene un patrón de expresión específico de retina en los portadores germinales

7. La sapropterina es eficaz en algunos pacientes con PKU porque actúa como:

a) Inhibidor competitivo que bloquea la acumulación de fenilalanina

b) Sustituto metabólico de la tirosina en la síntesis de neurotransmisores

c) **Chaperona farmacológica que estabiliza la PAH mutante con actividad residual, facilitando su plegamiento y aumentando su actividad**

d) Enzima recombinante sustitutiva de la fenilalanina hidroxilasa

8. La expansión del triplete CAG en *HTT* que causa la enfermedad de Huntington produce un fenotipo dominante de ganancia de función porque:

a) La pérdida de un alelo de huntingtina funcional genera haploinsuficiencia

b) El alelo CAG-expandido silencia el alelo normal por interferencia de ARN

c) La proteína poliQ truncada actúa como factor de transcripción aberrante

d) **La huntingtina con tramos largos de poliglutaminas forma agregados tóxicos que secuestran proteínas esenciales, independientemente de la huntingtina normal**

B. Verdadero o Falso

1. **Afirmación:** En la enfermedad de Gaucher tipo 1, la terapia de reposición enzimática con imiglucerasa corrige el defecto genético en las células del paciente.

Respuesta: **Falso.** La TRE provee la enzima exógenamente —no corrige la mutación en el ADN del paciente. La imiglucerasa es captada por los macrófagos (que expresan receptores de manosa-6-fosfato) y degrada el sustrato acumulado en los lisosomas. Los beneficios desaparecen si se suspende el tratamiento. Solo la terapia génica (en investigación) corregiría el defecto primario (Harvey, 2019).

2. **Afirmación:** Dado que la hemoglobina S se polimeriza solo en condiciones de baja oxigenación, los pacientes con drepanocitosis homocigota no presentan síntomas en reposo y en condiciones normoxémicas.

Respuesta: **Falso.** En la drepanocitosis homocigota (HbSS), la polimerización puede ocurrir incluso a PO2 relativamente normales en la microcirculación, donde la tensión de oxígeno cae significativamente. Los eritrocitos drepanocíticos tienen vida media reducida (∼10–20 días vs. 120 d normal), provocando anemia hemolítica crónica, crisis vaso- oclusivas episódicas y daño orgánico progresivo incluso sin exposición a hipoxia extrema (Strachan & Read, 2019).

3. **Afirmación:** En el CCR esporádico, la hipermetilación somática de *MLH1* equivale funcionalmente al segundo golpe de Knudson sobre la vía MMR.

Respuesta: **Verdadero.** En el 15 % de los CCR esporádicos con MSI-H, el silenciamiento de *MLH1* por hipermetilación de su promotor ocurre bialélicamente (primer y segundo golpe son ambos

epigenéticos). Esto equivale funcionalmente a la pérdida de función que ocurre por mutación en el síndrome de Lynch. El fenotipo molecular (MSI-H) y la respuesta a inmunoterapia son similares en ambos casos (Nussbaum et al., 2016).

C. Análisis de Casos

1. **Caso:** Una paciente de 28 años consulta por diagnóstico genético familiar. Su madre y una tía materna tienen cáncer de mama (a los 45 y 42 años, respectivamente). Se solicita panel BRCA1/2. Resultado: *BRCA2* p.Trp31Ter (c.93G>A), heterocigoto; clasificada patogénica (PVS1 + PM2 + PS4). **Preguntas:**

a) Aplique el modelo de dos golpes para explicar cómo esta variante de línea germinal puede eventualmente causar cáncer de mama en esta paciente.

b) La variante es nonsense en el exón 2 de *BRCA2*. ¿Qué mecanismos moleculares determinarían si esta variante produce una proteína truncada dominante negativa o si el ARNm es degradado por NMD?

c) Proponga las recomendaciones de cribado y prevención (farmacológica o quirúrgica) que el equipo interdisciplinar debería considerar para esta paciente.

2. **Caso:** Un paciente de 58 años con adenocarcinoma de páncreas es estudiado con panel NGS tumoral. Se detectan: *KRAS* G12D (VAF 74 %), *TP53* R248W (VAF 68 %), *CDKN2A* deleción homocigota (presente), *SMAD4* Q311Ter (VAF 61 %). TMB: 3,1 mut/Mb. Sin variantes en genes HR. MSS (estable en microsatélites).

Preguntas:

a) Ordene las mutaciones detectadas en una secuencia temporal de adquisición probable, justificando basándose en el modelo de oncogénesis por múltiples pasos.

b) ¿Qué implicación terapéutica tienen cada uno de los hallazgos moleculares? ¿Existe alguna terapia dirigida disponible actualmente para KRAS G12D?

c) Dado el perfil molecular (MSS, baja TMB, sin déficit HR), ¿qué probabilidad tiene este paciente de responder a inhibidores de PD-1? Justifique con criterios biomarker.

12.11 Glosario

Chaperona farmacológica Molécula pequeña que se une al sitio activo o a un dominio alostérico de una proteína con plegamiento defectuoso, estabilizándola y facilitando su tráfico intracelular al compartimento funcional. Ejemplos: sapropterina (PKU), migalastat (Fabry), lumacaftor (FQ-Phe508del).

Compound heterocigoto Genotipo en el que los dos alelos de un gen recesivo tienen mutaciones diferentes (no la misma mutación en homocigosis). Frecuente en fibrosis quística y PKU.

ERAD (ER-associated protein degradation) Sistema de control de calidad del RE que retiene y dirige a degradación proteasomal las proteínas mal plegadas; responsable de la degradación de CFTR p.Phe508del.

Exon skipping Estrategia terapéutica con oligonucleótidos antisentido que dirigen al espliceosoma para omitir un exón con mutación frameshift, restaurando el marco de lectura. Aprobado en DMD (eteplirsen, etc.).

GWAS Genome-Wide Association Study; estudio que busca asociaciones entre millones de SNP (polimorfismos de nucleótido único) y una enfermedad o rasgo complejo en cohortes de miles de individuos.

Haploinsuficiencia Estado en que un solo alelo funcional no produce suficiente cantidad de proteína para mantener la función normal; genera fenotipo dominante con un solo alelo mutado.

Hipótesis de dos golpes (Knudson) Modelo que propone que los genes supresores de tumores requieren la inactivación de ambos alelos para perder su función supresora; el primer golpe puede ser germinal (predisposición hereditaria) o somático.

LOH (pérdida de heterocigosidad) Pérdida del alelo silvestre de un gen supresor en una célula tumoral; constituye el «segundo golpe» en la oncogénesis de tumores con predisposición hereditaria.

Oncogén Gen mutado cuya activación constitutiva (GoF) promueve el crecimiento celular descontrolado; actúa de forma dominante con un solo alelo mutado. Deriva de proto-oncogenes normales.

Puntuación de riesgo poligénico (PRS) Valor numérico que combina el efecto de múltiples variantes comunes en el genoma para estimar la predisposición individual a una enfermedad multifactorial.

Rasopatías Grupo de síndromes del desarrollo causados por mutaciones de ganancia de función en componentes de la vía RAS/MAPK (PTPN11, HRAS, KRAS, BRAF); incluye síndrome de Noonan, Costello y cardiofaciocutáneo.

Reposición enzimática (TRE) Estrategia terapéutica para enfermedades por déficit enzimático (principalmente EAL) que consiste en la administración intravenosa periódica de la enzima recombinante producida en células de mamífero; no corrige el defecto genético pero reduce la acumulación del sustrato.

Supresor de tumores Gen cuya función normal frena la proliferación celular, activa la apoptosis o repara el ADN; su pérdida (recesiva a nivel celular) permite la desregulación del crecimiento.

12.12 Resumen

Las bases moleculares de las enfermedades humanas pueden agruparse en tres grandes categorías mecanísticas: déficit de función proteica (enfermedades recesivas), ganancia de función tóxica (dominantes) y acumulación progresiva de mutaciones somáticas (cáncer). Las enfermedades monogénicas ilustran estos mecanismos de manera paradigmática: la fibrosis quística (CFTR Phe508del, clase II) es el modelo de un defecto de plegamiento corregible farmacológicamente con chaperonas (lumacaftor) y potenciadores del canal

(ivacaftor); la PKU ilustra el bloqueo metabólico por déficit enzimático, tratable con sustratos alternativos de BH4 en respondedores; las hemoglobinopatías demuestran cómo una sola

sustitución de aminoácido (Glu6Val en HbS) puede generar polimerización patológica y anemia hemolítica grave; las distrofias musculares y las EAL ejemplifican cómo la comprensión exacta del defecto —clase de mutación y mecanismo molecular— determina la elegibilidad para terapias específicas (salto de exón, TRE, terapia génica).

La oncogénesis integra múltiples capas de regulación genómica: la hipótesis de Knudson explica la biología de los genes supresores (dos golpes necesarios para pérdida de función), mientras que los oncogenes solo requieren un alelo mutado (ganancia de función dominante). La secuencia adenoma-carcinoma del CCR ilustra la oncogénesis como proceso evolutivo multipasos en el que APC, KRAS, SMAD4 y TP53 deben acumularse secuencialmente. Las enfermedades multifactoriales, aunque de menor penetrancia individual, son las más prevalentes y generan las mayores oportunidades de personalización terapéutica mediante puntuaciones de riesgo poligénico y farmacogenómica. El bioquímico farmacéutico actúa en la intersección de todos estos conocimientos: interpreta las variantes identificadas por NGS, evalúa su elegibilidad para terapias dirigidas disponibles y monitoriza la respuesta con biomarcadores moleculares validados.

CAPÍTULO XIII

13 TÉCNICAS MOLECULARES, DIAGNÓSTICO Y BIOMARCADORES

13.1 Técnicas de Análisis de Ácidos Nucleicos

Los capítulos anteriores describieron las bases moleculares de diversas enfermedades. Conocer esas bases sería insuficiente sin las herramientas metodológicas que permiten detectar, cuantificar y caracterizar los ácidos nucleicos en muestras biológicas. Este capítulo describe las técnicas fundamentales que el bioquímico farmacéutico utilizará en el laboratorio de biología molecular clínica: extracción y control de calidad del ADN/ARN, reacción en cadena de la polimerasa en sus múltiples variantes, electroforesis, hibridación y secuenciación Sanger. Cada técnica se presenta con su principio, protocolo básico, aplicaciones y limitaciones para guiar su elección apropiada en el contexto diagnóstico.

13.2 Introducción

Las técnicas de análisis de ácidos nucleicos son la base operativa de la biología molecular clínica. Su historia es paralela al avance conceptual de la disciplina: la electroforesis en gel de agarosa (1970s), el Southern blotting (1975), la PCR descrita por Mullis (1990) y la secuenciación de Sanger et al. (1977) transformaron el diagnóstico genético, virólogico y oncológico. Hoy, estas técnicas convencionales siguen siendo el sustrato del que parten las plataformas más avanzadas de genómica clínica.

Para el bioquímico farmacéutico, el dominio de estas técnicas no es solo teórico: determina la calidad de los resultados, la capacidad de interpretación crítica de los informes de laboratorio y la detección de artefactos o errores preanalíticos. Un resultado de PCR falso-negativo por inhibidores en la muestra, o una secuenciación fallida por ARN degradado, pueden tener consecuencias diagnósticas graves. La trazabilidad del proceso analítico —desde la extracción hasta el informe— es responsabilidad directa del profesional de laboratorio (Bustin et al., 2009).

Este capítulo cubre cuatro áreas fundamentales: (1) extracción y control de calidad de ácidos nucleicos; (2) PCR convencional y sus variantes cuantitativas (qPCR, RT-qPCR); (3) electroforesis y técnicas de detección; (4) hibridación molecular y secuenciación Sanger. El capítulo 14 continuará con las técnicas avanzadas de secuenciación masiva y citogenética molecular.

13.3 Objetivos de Aprendizaje

Describir los principios de extracción de ADN genómico y ARN total, distinguiendo las fuentes de variabilidad preanalítica y los criterios de control de calidad (260/280, 260/230, RIN).

Explicar el mecanismo de la PCR convencional —desnaturalización, alineamiento, extensión— y sus parámetros de optimización (temperatura de hibridación, concentración de magnesio, diseño de cebadores).

Distinguir la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) de la PCR convencional en términos de principio, curva de calibración y métodos de cuantificación (ΔΔCt, curva estándar absoluta).

Interpretar un gel de agarosa con resultados de PCR, identificando bandas específicas, inespecíficas, dímeros de cebadores y ladders.

Aplicar los principios de la RT-qPCR para la cuantificación de expresión génica, integrando las directrices MIQE para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

Preguntas de Enfoque

1. ¿Por qué la calidad del ARN (RIN) es un factor crítico en los experimentos de RT-qPCR pero no en la secuenciación de ADN genómico?

2. ¿Cuál es la diferencia entre la eficiencia de amplificación de la PCR y la especificidad? ¿Cómo se optimizan de manera independiente?

3. ¿En qué situaciones clínicas se prefiere la detección cualitativa (presencia/ausencia) frente a la cuantificación absoluta de un ácido nucleico?

4. ¿Qué controles son obligatorios en un ensayo de PCR diagnóstico según los estándares de laboratorio clínico?

5. ¿Por qué la PCR convencional requiere electroforesis post-amplificación mientras que la qPCR no?

13.4 Extracción y control de calidad de ácidos nucleicos

13.4.1 Principios generales de extracción

La extracción de ácidos nucleicos busca aislar ADN o ARN de alta pureza e integridad desde matrices biológicas complejas (sangre, tejido fresco, tejido fijado en parafina FFPE, saliva, heces, biopsias líquidas) (Alberts et al., 2022). El proceso involucra:

1. **Lisis celular:** mecánica (sonicación, homogenización), química (detergentes: SDS, NP-40; agentes caotrópicos: guanidina tiocianato) o enzimática (proteinasa K).

2. **Separación de proteínas:** extracción orgánica clásica con fenol-cloroformo (interfase proteínica) o precipitación con alcohol.

3. **Purificación de los ácidos nucleicos:** columnas de sílice (unión selectiva de ADN/ARN en alta concentración de sal, elución en baja fuerza iónica), precipitación en etanol/isopropanol, o perlas magnéticas (automatizable).

Para extracción de ARN, es crítico trabajar en condiciones libres de ARNasas (RNasefree): agua tratada con DEPC, material libre de ARNasa, muestras en RNAlater o snap-freeze en nitrógeno líquido.

13.4.2 Control de calidad del ADN

Tabla 23. Parámetros de control de calidad del ADN/ARN extraído.

Parámetro	Método	Valor aceptable	Interpretación
A_{260}/A_{280}	NanoDrop / espectrofotometría UV	1.8–2.0 (ADN); 2.0–2.1 (ARN)	Contaminación proteica si <1.8; contaminante ARN si >2.0 (para ADN)
A_{260}/A_{230}	NanoDrop	1.8–2.2	Contaminación con fenol, EDTA, carbohidratos o sales caotrópicas si <1.8
RIN (RNA Integrity Number)	Bioanalyzer Agilent / TapeStation	7–10 para PCR; ≥8 para RNA-seq	Mide la relación de intensidad 28S/18S rRNA; refleja la integridad del ARN
Concentración	NanoDrop, Qubit (fluorimétrico)	Según aplicación (ej. ≥20 ng/µL para PCR)	Qubit es más específico para dsDNA que NanoDrop
Tamaño en gel	Electroforesis en agarosa 0,8 %	Banda de alto PM sin smearing para ADN genómico; bandas ribosomales para ARN	Degradación si se observa smearing o ausencia de bandas 28S/18S

Fuente: Bustin et al. (2009) y Alberts et al. (2022).

Nota. RIN = RNA Integrity Number; PM = peso molecular; dsDNA = ADN de doble hebra.

¡Importante!

ADN de tejido FFPE: el fijado en formalina produce entrecruzamientos ADNproteína y fragmentación. El ADN de FFPE tiene fragmentos de 100 bp a 300 bp; solo técnicas PCR de amplicón corto o captura con sondas son viables. La cuantificación con NanoDrop sobreestima la concentración de ADN utilizable; se recomienda Qubit o ddPCR para estimar el ADN amplificable (Strachan & Read, 2019).

13.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

13.5.1 Principio y ciclos de la PCR

La PCR, desarrollada por Kary Mullis en 1985–1988 (Mullis, 1990), amplifica exponencialmente un fragmento específico de ADN (*amplicón*) delimitado por dos cebadores oligonucleotídicos. Cada ciclo comprende tres etapas:

1. **Desnaturalización:** 94 ^(◦)C a 98 ^(◦)C, 15 s a 30 s →separación de las hebras del ADN molde.

2. **Alineamiento (annealing):** 50 ^(◦)C a 65 ^(◦)C, 20 s a 60 s →hibridación de los cebadores a sus secuencias complementarias en el ADN molde. La temperatura óptima (*Tm* −5 ^(◦)C) depende del contenido GC y la longitud del cebador.

3. **Extensión:** 72 ^(◦)C (óptimo de la Taq polimerasa), 1 m´ın por kb →síntesis del amplicón en dirección 5'→3'.

Tras *n* ciclos, el número de copias del amplicón es teóricamente 2^n. Con 30–35 ciclos, se obtiene una amplificación de 10^9 veces desde una sola molécula (Lewin et al., 2022). En la práctica, la eficiencia real varía (80 % a 100 % por ciclo) por inhibidores, estructura secundaria del amplicón o subóptima temperatura de alineamiento.

13.5.2 Diseño de cebadores

El diseño de cebadores es determinante para la especificidad y eficiencia de la PCR (Lodish et al., 2021):

Longitud: 18 nt a 25 nt. Contenido GC: 40 % a 60 %. *Tm* de cebadores dentro del mismo par: diferencia <5 ^(◦)C. Sin complementariedad interna o entre cebadores (impide dímeros). Verificación de especificidad: BLAST contra el genoma de referencia. Terminación 3' con G o C (*GC clamp*) para asegurar extensión eficiente.

13.5.3 Variantes de la PCR

Tabla 24. Variantes de la PCR y sus aplicaciones en el laboratorio clínico.

Variante	Principio diferencial	Aplicación clínica
PCR múltiplex	Varios pares de cebadores en una sola reacción	Panel de patógenos respiratorios (influenza A/B, SARS-CoV-2, VRS), panel CFTR
PCR nested	Dos rondas: amplicón externo primero, luego interno con cebadores internos	Detección de ADN viral en muestras de baja carga (VIH en LCR, CMV en humor acuoso)
PCR alelo-específica (AS-PCR)	El 3' del cebador discrimina el alelo mutante del silvestre	Genotipado rápido de variantes de punto único (p. ej., KRAS G12D en tejido)

PCR asimétrica	Exceso de uno de los cebadores → amplicón de simple hebra	Secuenciación Sanger directa sin clonación; algunos ensayos de hibridación
PCR de fusión larga (LA-PCR)	Polimerasa de alta fidelidad + extensión prolongada	Amplificación de exones grandes (BRCA1/2) o regiones de hasta 30 kb
COLD-PCR	Desnaturalización a temperatura crítica baja; enriquece alelos minoritarios	Detección de mutaciones somáticas a baja VAF en biopsia líquida

Fuente: Lewin et al. (2022) y Bustin et al. (2009).

Nota. VAF = variant allele fraction; LCR = líquido cefalorraquídeo; CMV = citomegalovirus.

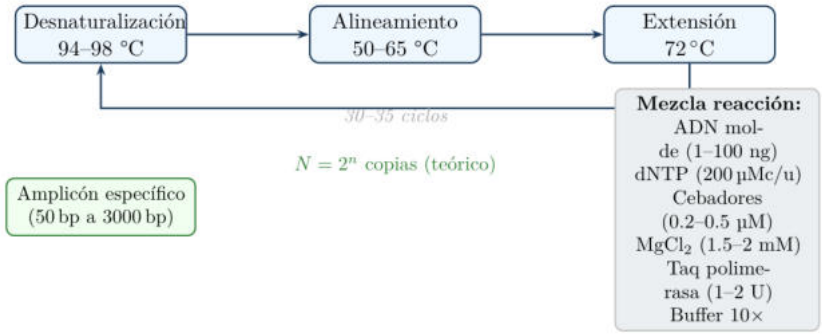


Figura 32. Etapas y componentes de la PCR convencional.

Cada ciclo incluye desnaturalización, alineamiento de cebadores y extensión; tras 30–35 ciclos se obtienen ∼10^9 copias del amplicón. Los valores de temperatura y concentración son orientativos y deben optimizarse para cada par de cebadores. Elaboración propia basada en Mullis (1990) y Lodish et al. (2021).

13.6 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) y RTqPCR

13.6.1 Principio de la qPCR

La qPCR (también llamada PCR en tiempo real) detecta la fluorescencia emitida por agentes intercalantes o sondas durante la amplificación, permitiendo cuantificar el ADN molde sin necesidad de electroforesis post-PCR (Bustin et al., 2009):

SYBR Green I: colorante intercalante que fluorece al unirse al ADN de doble hebra. Sencillo y económico; requiere curva de disociación (*melt curve*) para verificar especificidad (una sola *Tm* indica amplicón único).

Sondas TaqMan: oligonucleótido con fluoróforo (reporter) en el extremo 5' y quencher en 3', complementario a la secuencia interna del amplicón. La actividad exonucleasa 5'→3' de la Taq degrada la sonda durante la extensión, liberando fluorescencia. Mayor especificidad que SYBR Green; permite multiplexado con fluoróforos de distintas longitudes de onda.

Parámetros clave:

Ct (ciclo umbral): ciclo en el que la fluorescencia supera el umbral definido por el software. Inversamente proporcional a la cantidad inicial de molde. **Eficiencia de amplificación (E):** calculada a partir de la curva estándar. Valor aceptable: E = 90 % a 110 % ($R^2 \geq 0{,}99$). Indica que la cantidad de ADN se duplica cada ciclo.

13.6.2 RT-qPCR: cuantificación de expresión génica

La RT-qPCR (*reverse transcription-quantitative PCR*) combina la retro- transcripción del ARN a ADNc con la amplificación por qPCR para cuantificar la expresión génica (Bustin et al., 2009). Los pasos son:

1. **Extracción de ARN total** y control RIN (≥7).

2. **Eliminación de ADN genómico:** tratamiento con DNasa I libre de ARNasa (en columna o en solución).

3. **Síntesis de ADNc (RT):** retrotranscriptasa (MMLV-RT o SuperScript) con oligo(dT), hexámeros aleatorios o cebadores específicos del gen.

4. **qPCR del ADNc:** cebadores que flanqueen una unión exón-exón para evitar amplificación de ADN genómico residual.

Cuantificación:

Método ΔΔCt (cuantificación relativa): normalización con gen de referencia estable (GAPDH, ACTB, B2M); cálculo del cambio relativo de expresión: 2^(−)^(ΔΔCt). **Curva estándar absoluta:** serie de diluciones de estándar cuantificado (amplicón sintetizado o plásmido) para obtener copias/reacción.

Concepto Clave

Las directrices MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative PCR Experiments), propuestas por Bustin et al. (2009),

son el estándar para garantizar la reproducibilidad de RT-qPCR: especifican los requisitos mínimos de reporte en extracción de ARN, síntesis de ADNc, diseño de cebadores, eficiencia, referencia estable y controles. El bioquímico farmacéutico debe aplicar MIQE tanto en investigación como en el diagnóstico de expresión génica (p.ej. BCR-ABL1 cuantitativo en LMC) (Bustin et al., 2009).

13.7 Electroforesis en gel de agarosa y poliacrilamida

13.7.1 Principio y resolución

La electroforesis separa fragmentos de ácidos nucleicos por tamaño en un campo eléctrico. Los ácidos nucleicos migran al polo positivo (ánodo) a velocidad inversamente proporcional al logaritmo de su tamaño en pares de bases (Alberts et al., 2022):

Gel de agarosa: concentración 0,8 % a 3 %; rango de resolución 100 bp a 20,000 bp. Alta concentración para pequeños fragmentos (p.ej. 3 % para fragmentos de 50–200 bp).

Gel de poliacrilamida (PAGE): resolución de un solo nucleótido; usado en electroforesis capilar de secuenciación Sanger y en análisis de STR (capítulo 14).

Visualización: bromuro de etidio (BrEt, cancerígeno; requiere manejo controlado) o SYBR Safe (alternativa menos tóxica) intercalados en el gel o añadidos post-electroforesis.

13.7.2 Interpretación de un gel de PCR

Banda única del tamaño esperado: amplificación específica. **Múltiples bandas:** amplificación inespecífica (subir temperatura de alineamiento, añadir DMSO o betaína, rediseñar cebadores).

Banda de bajo peso molecular (<100 bp**):** dímeros de cebadores (reducir concentración de cebadores, aumentar temperatura de alineamiento).

Ausencia de banda: fallo de amplificación (ADN de baja calidad, inhibidores, *Tm* incorrecta); verificar con control positivo.

Smearing: amplificación no específica generalizada o ADN degradado; reducir ciclos o cantidad de ADN.

En el Laboratorio

Protocolo básico de electroforesis de productos de PCR:

1. Preparar gel de agarosa al 1,5 % en tampón TAE 1× con SYBR Safe 0,5 µL/100mL.

2. Calentar hasta disolver, verter en cuba con peine de 1 mm; solidificar 30 min a temperatura ambiente.

3. Mezclar 5 µL de producto PCR + 1 µL de tampón de carga 6× (azul de bromofenol + glicerol).

4. Cargar junto con marcador de peso molecular de 100 bp.

5. Electroforesis a 100 V en TAE 1×, 30 m´ın a 45 m´ın.

6. Visualizar en transiluminador UV o luz azul (SYBR Safe) y fotografiar.

Controles obligatorios: control positivo (ADN con la diana conocida), control negativo (NTC: no template control, agua en lugar de ADN).

13.8 Hibridación molecular: Southern, Northern blotting y sondas

13.8.1 Southern blotting

El Southern blotting, desarrollado por Southern (1975), permite detectar fragmentos de ADN de tamaño específico en una mezcla compleja (Alberts et al., 2022):

1. ADN genómico digerido con enzima de restricción. 2. Electroforesis en gel de agarosa. 3. Transferencia (*blotting*) a membrana de nailon o nitrocelulosa. 4. Hibridación con sonda marcada (radiactiva ^{32}P o fluorescente) complementaria a la secuencia de interés. 5. Lavado y detección: las bandas positivas revelan el/los fragmento(s) que contienen la secuencia.

Aplicaciones: diagnóstico de expansión de repeticiones (Huntington, X frágil) cuando el análisis de STR convencional no es concluyente; diagnóstico de grandes reorganizaciones génicas (inversiones en hemofilia A); verificación de integridad del genoma en células madre.

13.8.2 Northern blotting y análisis de ARN

El Northern blotting sigue el mismo principio que el Southern pero con ARN en lugar de ADN; permite detectar transcritos de tamaño

específico, isoformas de splicing y expresión relativa (Lodish et al., 2021). Requiere condiciones libres de ARNasas a lo largo de todo el protocolo.

13.8.3 FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)

La FISH usa sondas de ADN marcadas fluorescentemente que hibridan directamente con cromosomas metafásicos o núcleos interfásicos para detectar y localizar secuencias específicas (capítulo 14 para detalle completo).

13.9 Secuenciación Sanger: principio, aplicaciones y limitaciones

13.9.1 Principio del método didesoxi

La secuenciación Sanger (*dideoxy chain termination*), desarrollada por Frederick Sanger en 1977 (Sanger et al., 1977), determina la secuencia de un fragmento de ADN de hasta ∼1000 pb. El principio es:

1. La ADN polimerasa extiende un cebador usando el ADN molde. 2. La mezcla contiene los cuatro dNTP normales más pequeñas cantidades de didesoxi-NTP (ddNTP: ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) marcados con fluoróforos distintos. 3. Cuando se incorpora un ddNTP, la extensión se termina (sin OH libre en 3'). 4. Se generan millones de fragmentos de todos los tamaños posibles, cada uno terminado en un ddNTP fluorescente que indica el nucleótido en esa posición. 5. Separación por electroforesis capilar (poliacrilamida), lectura del fluoróforo en el detector →electroferograma de picos coloreados.

13.9.2 Aplicaciones y limitaciones

Aplicaciones: verificación de clones, confirmación de variantes identificadas por NGS, secuenciación de exones candidatos en enfermedades monogénicas, farmacogenómica (CYP2C9, CYP2D6 en algunos alelos).

Limitaciones: cubre solo 500 bp a 1000 bp por reacción; no detecta variantes con VAF <20 % (no adecuado para detección de mutaciones somáticas en tumor heterogéneo); no detecta CNV ni grandes reorganizaciones; costo prohibitivo para análisis a escala genómica.

¿Sabías que. . . ?

El proyecto Genoma Humano, completado en 2003, utilizó la secuenciación Sanger en secuenciadores automáticos de electroforesis capilar de 96 canales para generar los 3,2 × 10^9 bp de la secuencia de referencia. Costó ~$3 000 000 000 y tardó 13 años. Hoy, la secuenciación de genoma completo de un individuo se realiza en menos de 48 horas por menos de $ 1000 con tecnologías de nueva generación (Alberts et al., 2022; Sanger et al., 1977).

Caso Clínico

Caso clínico 1 — Diagnóstico molecular de leucemia mieloide crónica por RT-qPCR de BCR-ABL1 Contexto clínico: Hombre de 45 años con leucocitosis (85 × 10^9 leucocitos/L), esplenomegalia y basofilia. Cariotipo en médula ósea: 100 % metafases con cromosoma Filadelfia t(9;22)(q34;q11.2). Diagnóstico: leucemia mieloide crónica (LMC), fase crónica.

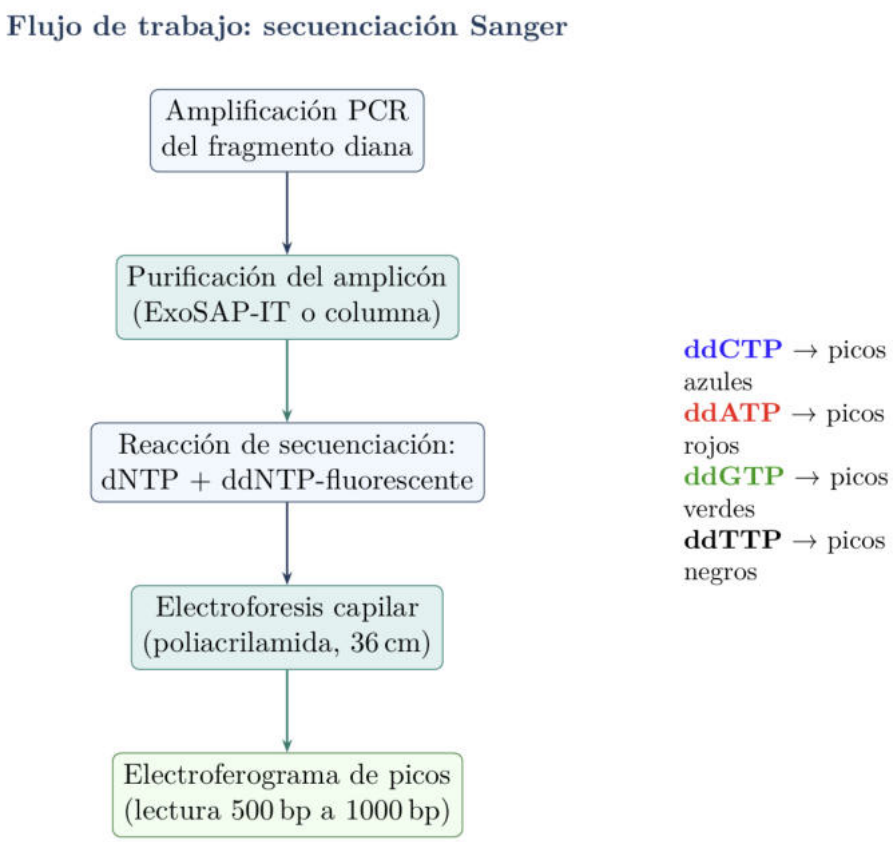


Figura 33. Flujo de la secuenciación Sanger con electroforesis capilar.

El producto de PCR purificado se usa como molde en la reacción de secuenciación con ddNTP fluorescentes; la electroforesis capilar separa los fragmentos y el detector registra el electroferograma. Elaboración propia basada en Sanger et al. (1977) y Alberts et al. (2022).

Monitorización molecular: El tratamiento con imatinib mesylato (inhibidor de BCR-ABL1, 400 mg d^(−)¹) se monitoriza mediante RT-qPCR cuantitativa del transcrito BCR-ABL1 p210 (e14a2 o e13a2) en

sangre periférica según la Escala Internacional (IS) (Bustin et al., 2009).

Protocolo RT-qPCR:

1. Extracción de ARN total de sangre periférica (PAXgene Blood RNA Tube). RIN = 8,2; *A*260/*A*280 = 2,01; 480 ng/µL.

2. Síntesis de ADNc con SuperScript IV RT, hexámeros aleatorios, 1 µg de ARN total.

3. qPCR en dúplex: sonda TaqMan para BCR-ABL1 (FAM) y gen de referencia ABL1 total (VIC); placa de 96 pocillos; triplicados.

4. Curva estándar con plásmido de copia conocida para cuantificación absoluta.

5. Resultado expresado como % BCR-ABL1^(IS) = (copias BCR-ABL1 / copias ABL1) ×100.

Resultados secuenciales (tras inicio de imatinib):

Basal: 98,5 %^(IS) (log10 reducción 0). 3 meses: 12,4 %^(IS) (reducción 0.9 log). 6 meses: 0,85 %^(IS) (reducción 2.06 log). 12 meses: 0,05 %^(IS) (reducción 3.29 log; respuesta molecular mayor, MMR).

Preguntas de razonamiento:

1. ¿Por qué se normaliza el resultado de BCR-ABL1 contra el gen ABL1 total en lugar de un gen de referencia universal como GAPDH?

2. A los 18 meses, el paciente presenta un aumento de BCR-ABL1 a 0,32 %^(IS) (pérdida de MMR). ¿Qué estudio molecular de resistencia solicitaría para guiar el cambio de terapia?

3. Explique por qué un resultado de 0 % (indetectable) no equivale necesariamente a curación y qué protocolo de seguimiento aplicaría.

Concepto Clave

Principio integrador del capítulo: Las técnicas de análisis de ácidos nucleicos son el puente entre el conocimiento teórico de la biología molecular y su aplicación diagnóstica y farmacológica. La PCR —en sus variantes convencional, cuantitativa y con retrotranscripción— es el eje central. La calidad de la muestra (RIN, ratios de absorbancia), el control estricto de cada paso analítico y el uso de controles adecuados determinan la confiabilidad del resultado. La secuenciación Sanger sigue siendo el estándar de confirmación para variantes identificadas por técnicas de cribado, complementándose con las plataformas NGS del capítulo 14.

13.10 Actividades de Consolidación

Actividad 1 — Diseño de un ensayo de RT-qPCR para cuantificación de expresión génica

Objetivo: Diseñar un experimento completo de RT-qPCR para cuantificar la expresión del gen *BRCA1* en líneas celulares de cáncer de mama tratadas con un inhibidor epigenético, siguiendo las directrices MIQE.

Instrucciones:

1. Seleccionar y justificar el gen de referencia más apropiado para líneas MCF-7 y MDA-MB-231 (entre GAPDH, ACTB, RPLP0, B2M) considerando la estabilidad ante el tratamiento farmacológico.

2. Diseñar los cebadores para el amplicón de *BRCA1*: exones 15–16, unión exón-exón, tamaño 90 bp a 150 bp, contenido GC 50 %, *Tm* 60 ^(◦)C.

3. Calcular la concentración del ARN de partida, definir el control NTC, el control de contaminación genómica (sin RT) y el control de integridad del ARN.

4. Definir el método de cuantificación (ΔΔCt) y la interpretación estadística del resultado.

Entregable: Tabla de diseño experimental con secuencias de cebadores propuestas, controles y criterios MIQE de validación.

Actividad 2 — Interpretación de un gel de agarosa

Objetivo: Interpretar los resultados de un gel de PCR multiplex para diagnóstico de fibrosis quística.

Instrucciones: Se describe un gel de 3 % de agarosa con 8 carriles: marcador de 50 bp; control negativo (agua); control positivo (CFTR WT); 5 muestras de pacientes. Tamaños esperados: amplicón WT exón 10 = 197 bp; deleción p.Phe508del = 194 bp (diferencia de 3 bp detectable solo en PAGE, no en agarosa).

1. Identifique las limitaciones del gel de agarosa para distinguir WT vs. Phe508del (diferencia de solo 3 bp).

2. Proponga una alternativa técnica más adecuada para el diagnóstico de esta variante específica.

3. Defina qué resultados de los 5 pacientes serían diagnósticos de portador, afectado u homocigoto WT, asumiendo que se detecta la deleción.

Entregable: Interpretación del gel simulado, análisis de limitaciones y propuesta de técnica alternativa con justificación.

13.11 Preguntas de Autoevaluación

A. Selección Múltiple

1. El valor *A*260/*A*280 de una muestra de ARN es 1.62. Esto indica principalmente:

a) Contaminación con ARN ribosómico

b) **Contaminación proteica; el ARN puro debería tener un valor de 2.0–2.1**

c) ADN genómico en la muestra

d) Contaminación con isopropanol del paso de precipitación

2. ¿Cuál es la función del ddNTP en la secuenciación Sanger?

a) Aumentar la fidelidad de la polimerasa durante la síntesis

b) Marcar el ADN para su detección fluorescente sin interrumpir la síntesis

c) **Terminar la extensión de la cadena al incorporarse, porque carece del grupo OH en 3' necesario para la elongación**

d) Desnaturalizar el ADN molde para facilitar el alineamiento del cebador

3. En qPCR con SYBR Green, la curva de disociación (*melt curve*) se realiza para:

a) Calcular la eficiencia de amplificación de la PCR

b) **Verificar la especificidad del amplicón: un pico único indica una sola especie de ADN amplificado**

c) Determinar el número de copias inicial del molde

d) Comparar las eficiencias de distintas sondas TaqMan

4. Un control NTC (No Template Control) sin banda en el gel de PCR indica:

a) Que los cebadores no funcionan y hay un fallo de amplificación

b) Que el gel no fue correctamente preparado

c) **Que no hay contaminación en los reactivos y la amplificación es específica del molde**

d) Que la polimerasa no tiene actividad enzimática

5. En una RT-qPCR, los cebadores diseñados para flanquear una unión exón-exón sirven para:

a) Aumentar el rendimiento de la amplificación del ADNc

b) Asegurar que la reacción funcione a la temperatura de hibridación más alta posible

c) **Evitar la amplificación de ADN genómico contaminante, que incluye el intrón entre ambos exones**

d) Detectar isoformas de splicing alternativo en el amplicón generado

6. El método ΔΔCt en RT-qPCR calcula el cambio relativo de expresión de un gen de interés mediante:

a) Comparación directa de las concentraciones de ARN total entre muestras

b) Uso de una curva estándar de copias conocidas para cuantificación absoluta

c) **Normalización del Ct del gen diana con el Ct del gen de referencia estable y comparación entre condición experimental y control**

d) Medición de la fluorescencia al final del último ciclo de PCR

7. El índice RIN (RNA Integrity Number) es determinado por:

a) El espectrofotómetro NanoDrop midiendo la absorbancia a 260 nm

b) La relación *A*260/*A*230 en el NanoDrop

c) **La electroforesis microfluídica (Bioanalyzer/TapeStation) que mide la integridad de las bandas ribosómicas 28S y 18S**

d) La precipitación en etanol y la medición de la concentración por peso

8. Una PCR alelo-específica (AS-PCR) discrimina variantes de un solo nucleótido porque:

a) Usa una enzima de restricción que corta solo el alelo mutante

b) Emplea sondas TaqMan con fluoróforos distintos para cada alelo

c) La Taq polimerasa tiene actividad exonucleasa que verifica el apareamiento exacto de toda la longitud del cebador

d) **El extremo 3' del cebador está diseñado para alinear exactamente con el nucleótido polimórfico; cualquier desapareamiento en 3' impide la extensión**

B. Verdadero o Falso

1. **Afirmación:** El bromuro de etidio puede añadirse al gel de agarosa antes de la polimerización para visualizar el ADN directamente durante la electroforesis sin necesidad de pasos adicionales de tinción.

Respuesta: **Verdadero.** El BrEt puede incorporarse al gel antes de verter o añadirse al tampón de electroforesis. Sin embargo, esto presenta desventajas: el BrEt puede reducir la movilidad del ADN y

aumenta la exposición del personal al mutágeno. Muchos laboratorios prefieren la tinción post-electroforesis o el uso de SYBR Safe pre-incorporado, que es más seguro. En ambos casos, la visualización requiere transiluminador UV (SYBR Safe también es detectable con luz azul de 470 nm) (Alberts et al., 2022).

2. **Afirmación:** Un valor de RIN de 5 es aceptable para realizar RT-qPCR de alta calidad en un experimento de expresión génica diferencial.

Respuesta: **Falso.** Un RIN de 5 indica ARN significativamente degradado. Según las directrices MIQE propuestas por Bustin et al. (2009), se recomienda un RIN ≥7 para RT-qPCR estándar y ≥8 para RNA-seq. El ARN degradado contiene fragmentos más cortos, lo que subestima la expresión de amplicones largos (3' del transcrito menos afectado que el 5'), genera resultados sesgados y no reproducibles (Bustin et al., 2009).

3. **Afirmación:** La eficiencia de amplificación de la PCR puede ser superior al 100 % si la curva estándar se construye correctamente, indicando que hay más copias finales de las esperadas.

Respuesta: **Falso.** Teóricamente, la eficiencia máxima es 100 % (duplicación exacta cada ciclo). Valores superiores al 110 % en la curva estándar indican errores experimentales: inhibición diferencial entre puntos de la curva, pipeteo inexacto o estándar mal cuantificado. Una eficiencia aceptable es 90 % a 110 % (R^2 ≥0,99); fuera de este rango, los resultados no son cuantitativamente fiables (Bustin et al., 2009).

C. Análisis de Casos

1. **Caso:** Un laboratorio de diagnóstico recibe una muestra de ARN total de biopsia pulmonar con los siguientes valores: $A260/A280$ = 2,05; $A260/A230$ = 1,35; RIN = 7,8. La muestra fue procesada con TriPure según el protocolo estándar.

Preguntas:

a) Evalúe la calidad de la muestra: ¿qué parámetros son aceptables y cuál presenta una anomalía? ¿Qué contaminante probable indica ese parámetro?

b) ¿Puede realizarse RT-qPCR con esta muestra? Justifique su respuesta e indique si algún paso adicional mejoraría la calidad.

c) Proponga las posibles causas técnicas del valor $A260/A230$ alterado en el protocolo TriPure y cómo prevenirlas.

2. **Caso:** Un técnico realiza una qPCR para cuantificar BCR-ABL1 en sangre periférica de un paciente con LMC. Los resultados muestran: Control positivo (100 copias): Ct = 32.5; muestra del paciente: Ct = 32.2; NTC (agua): Ct = 33.8. La curva estándar da E = 88 %; R^2 = 0,97.

Preguntas:

a) Identifique al menos dos problemas metodológicos en estos resultados y explique su significado.

b) ¿Puede reportarse el resultado del paciente como válido? Justifique con criterios técnicos.

c) Proponga las acciones correctivas necesarias antes de emitir un informe diagnóstico.

13.12 Glosario

*A*260/*A*280 Razón de absorbancia ultravioleta que refleja la pureza de los ácidos nucleicos respecto a proteínas. Valores óptimos: 1.8–2.0 para ADN y 2.0–2.1 para ARN.

ADNc (ADN complementario) Cadena de ADN sintetizada por la retrotranscriptasa usando ARNm como molde; carece de intrones. Es el punto de partida de la RT-qPCR y la clonación de genes eucariotas.

Ct (ciclo umbral) En qPCR, ciclo en el que la fluorescencia supera el umbral establecido; inversamente proporcional a la concentración de ADN molde inicial.

ddNTP Didesoxi-nucleótido trifosfato; carece del grupo OH en 3'; cuando se incorpora, termina la extensión de la cadena de ADN. Fundamento de la secuenciación Sanger.

Dímeros de cebadores Subproductos de la PCR formados por la hibridación y extensión de los dos cebadores entre sí; aparecen como bandas de muy bajo peso molecular en el gel de agarosa.

Eficiencia de PCR Parámetro que indica el porcentaje de duplicación del amplicón en cada ciclo; calculado a partir de la pendiente de la curva estándar de qPCR. Valor óptimo: 90–110 %.

Escala Internacional (IS) Escala estandarizada de referencia para reportar los resultados de RT-qPCR de BCR-ABL1 en LMC, expresados como % BCR-ABL1/ABL1 en una escala logarítmica.

MIQE Minimum Information for Publication of Quantitative PCR Experiments; directrices publicadas por Bustin et al. (2009) que definen los requisitos mínimos de información para garantizar la reproducibilidad y calidad de los experimentos de qPCR.

NTC (No Template Control) Control negativo en PCR/qPCR que contiene todos los reactivos excepto el ADN molde (reemplazado por agua). La ausencia de amplificación en el NTC confirma la ausencia de contaminación.

RIN (RNA Integrity Number) Índice numérico de 1 a 10 que refleja la integridad del ARN a partir del electroferograma de electroforesis microfluídica; basado en la relación de las bandas 28S y 18S rRNA.

RT-qPCR Reverse Transcription-quantitative PCR; técnica que combina la retrotranscripción del ARN a ADNc con la amplificación cuantitativa en tiempo real; permite cuantificar la expresión génica.

Sonda TaqMan Oligonucleótido marcado con un fluoróforo (5') y un quencher (3') que hibrida al amplicón; la exonucleasa 5'→3' de la Taq degrada la sonda durante la extensión, liberando fluorescencia proporcional a la cantidad de amplicón.

Southern blotting Técnica de hibridación que detecta fragmentos específicos de ADN en una mezcla compleja tras digestión con

enzimas de restricción, electroforesis, transferencia a membrana e hibridación con sonda marcada.

SYBR Green I Colorante intercalante del surco menor del ADN de doble hebra que emite fluorescencia al unirse; usado en qPCR; requiere curva de disociación para verificar especificidad.

13.13 Resumen

Las técnicas de análisis de ácidos nucleicos constituyen la herramienta operativa del bioquímico farmacéutico en el laboratorio de biología molecular clínica. La cadena analítica comienza con la extracción de ADN o ARN: la pureza se evalúa por las ratios $A260/A280$ (1.8–2.0 para ADN, 2.0–2.1 para ARN) y $A260/A230$ (1.8–2.2), mientras que la integridad del ARN se cuantifica con el RIN (mínimo 7 para RT-qPCR). Las muestras FFPE representan un desafío preanalítico especial por la fragmentación del ADN inducida por el proceso de fijación, requiriendo protocolos de extracción específicos y amplificación de amplicones cortos.

La PCR es la piedra angular de la detección de ácidos nucleicos: sus tres etapas —desnaturalización, alineamiento, extensión— generan una amplificación exponencial del amplicón específico. El diseño apropiado de cebadores (longitud 18–25 nt, GC 40–60 %, *Tm* similares, sin dímeros, GC-clamp en 3') determina la especificidad y la eficiencia. Las variantes de la PCR —múltiplex, nested, alelo-específica, COLD-PCR— amplían el rango de aplicaciones clínicas. La qPCR añade la dimensión cuantitativa mediante la detección de fluorescencia en tiempo real con SYBR Green (requiere melt curve) o

sondas TaqMan (alta especificidad, multiplexable); el Ct es inversamente proporcional a la cantidad inicial de molde y la eficiencia aceptable es 90–110 %. La RT-qPCR, regulada por las directrices MIQE, es el estándar para la cuantificación de la expresión génica y el monitoreo de respuesta terapéutica (BCR-ABL1 en LMC).

La electroforesis en gel de agarosa proporciona una verificación visual cualitativa de los productos de PCR; la poliacrilamida resuelve hasta diferencias de un nucleótido. La secuenciación Sanger —basada en la terminación por ddNTP y la separación por electroforesis capilar— cubre 500–1000 bp por reacción, siendo el estándar de confirmación de variantes. Sus limitaciones (baja sensibilidad para alelos minoritarios, incapacidad de detectar CNV, costo para escala genómica) son las que justifican el uso de las tecnologías NGS descritas en el capítulo 14.

CAPÍTULO XIV

14 TÉCNICAS CITOGENÉTICAS Y MOLECULARES AVANZADAS

El capítulo anterior presentó las técnicas de análisis de ácidos nucleicos de primera línea —PCR, qPCR, electroforesis y secuenciación Sanger— que forman la base del laboratorio de biología molecular clínica. Este capítulo eleva la resolución diagnóstica al nivel genómico y cromosómico completo, describiendo las tecnologías que han revolucionado la medicina de precisión en el siglo XXI: la hibridación fluorescente in situ (FISH), los arrays cromosómicos (SNP-array y aCGH), la secuenciación de nueva generación (NGS) y la PCR digital. El bioquímico farmacéutico que comprende y aplica estas plataformas puede participar activamente en la caracterización genómica de tumores, en el diagnóstico prenatal avanzado y en la implementación de paneles farmacogenómicos comprehensivos.

14.1 Introducción

La transición desde la secuenciación Sanger y el cariotipo convencional hacia las plataformas genómicas de alta resolución representa uno de los cambios paradigmáticos más importantes de la biomedicina contemporánea. Mientras el cariotipo convencional (resolución ~5 Mb) permite detectar grandes translocaciones y aneuploidías, las técnicas descritas en este capítulo ofrecen resoluciones desde 100 kb (aCGH) hasta la base individual (NGS), permitiendo identificar variantes que en el pasado eran simplemente invisibles (Alberts et al., 2022; Nussbaum et al., 2016).

La secuenciación de nueva generación (NGS), también denominada secuenciación de siguiente generación o secuenciación masiva paralela (MPS), produce millones de lecturas cortas de ADN simultáneamente, permitiendo el análisis completo del exoma (WES) o del genoma completo (WGS) en un solo experimento (Strachan & Read, 2019). Las aplicaciones clínicas actuales incluyen paneles de oncología somática, pruebas de portador de enfermedades recesivas, diagnóstico prenatal no invasivo (DPNI) y paneles farmacogenómicos comprehensivos.

La FISH sigue siendo irreemplazable para la detección rápida de translocaciones y

amplificaciones cromosómicas en tejidos parafinados y para la confirmación de hallazgos de arrays. La PCR digital (dPCR) ha añadido una dimensión de precisión cuantitativa sin precedentes para la detección de variantes de baja frecuencia alélica en biopsia líquida (Relling & Evans, 2015).

14.2 Objetivos de Aprendizaje

Describir el principio de la FISH y sus variantes (FISH de locus específico, M-FISH, SKY) relacionándolas con sus aplicaciones en diagnóstico oncológico y citogenético. Explicar los fundamentos de los arrays cromosómicos (aCGH y SNP-array) para la detección de variaciones en el número de copias (CNV) y regiones de disomía uniparental (UPD). Describir el flujo de trabajo de la NGS —preparación de librería, secuenciación, alineamiento, llamada de variantes— y sus aplicaciones clínicas en oncología y genética médica.

Comparar los paneles NGS de genes específicos con el exoma completo y el genoma completo en términos de profundidad de cobertura, costo y utilidad clínica. Aplicar el concepto de PCR digital (ddPCR) para la cuantificación absoluta de variantes de baja frecuencia en biopsia líquida.

14.3 Preguntas de Enfoque

1. ¿En qué situaciones clínicas la FISH ofrece ventajas sobre el cariotipo convencional y sobre el NGS?

2. ¿Por qué la profundidad de cobertura en NGS es crítica para la detección de variantes somáticas en tumores heterogéneos?

3. ¿Cuál es la diferencia fundamental entre un panel de genes y un exoma completo en NGS, y cómo influye en la probabilidad diagnóstica?

4. ¿Por qué la biopsia líquida con ddPCR es preferible a la PCR convencional para monitorizar la carga tumoral circulante?

5. ¿Qué implicaciones éticas y de manejo tienen los «hallazgos incidentales» que surgen en el análisis de genoma completo?

14.4 FISH: hibridación fluorescente in situ

14.4.1 Principio y flujo de trabajo

La FISH detecta y localiza secuencias específicas de ADN en cromosomas metafásicos o núcleos en interfase, utilizando sondas de

ADN marcadas fluorescentemente (Nussbaum et al., 2016). El protocolo incluye:

1. **Preparación del material:** extensiones de metafase (sangre estimulada con fitohemaglutinina) o cortes de tejido FFPE.

2. **Desnaturalización:** muestra y sonda se desnaturalizan por calor (73 ^(◦)C) en formamida.

3. **Hibridación:** incubación de 16–24 h a 37 ^(◦)C; la sonda se une específicamente a su secuencia complementaria en el cromosoma.

4. **Lavados astringentes:** eliminan sondas no unidas específicamente.

5. **Detección:** microscopio de fluorescencia con filtros para cada fluoróforo (DAPI counterstain azul + señales de color del locus/sonda).

14.4.2 Tipos de sondas FISH

Tabla 25. Tipos de sondas FISH, sus blancos y aplicaciones clínicas.

Tipo de sonda	Blanco / diseño	Aplicación clínica
Locus específica (LSI)	Un locus genómico definido	Detección de deleciones (5q-, 17p13 en TP53), amplificaciones (HER2), fusiones
Centrómero (CEP)	Secuencias α-satélite centroméricas	Aneuploidías (monosomía 7 en LMA, trisomía 12 en LLC)
Sonda de fusión (break-apart)	Flanquea los puntos de fusión de una translocación	t(9;22)/BCR-ABL1 en LMC, t(15;17)/PML-RARA en LMA-M3
Sonda dual-fusión	Une los dos fragmentos de la fusión en diferentes colores	Confirma la fusión génica de ambas cepas fusionadas

M-FISH / SKY	Mezcla de sondas de todos los cromosomas, cada uno con diferente combinación de fluoróforos	Cariotipado completo fluorescente; detecta translocaciones crípticas

Fuente: Nussbaum et al. (2016) y Strachan & Read (2019).

Nota. LMA = leucemia mieloide aguda; LMC = leucemia mieloide crónica; LLC = leucemia linfocítica crónica; M-FISH = multiplex FISH; SKY = spectral karyotyping.

Aplicación paradigmática: la sonda *break-apart* para ALK en NSCLC detecta la inversión del cromosoma 2p que genera la fusión EML4-ALK; la positividad (señales separadas en el núcleo) predice respuesta a crizotinib y alectinib con alta sensibilidad (>95 %) (Relling & Evans, 2015).

Concepto Clave

La FISH tiene resolución 100 kb a 200 kb, localiza secuencias directamente en el contexto cromosómico o nuclear, y es aplicable en tejido FFPE. Su limitación es que solo detecta los loci para los que existe una sonda; no es un análisis global del genoma. Para un análisis genómico sin hipótesis previa, se requieren arrays o NGS.

14.5 Arrays cromosómicos: aCGH y SNP-array

14.5.1 Hibridación genómica comparativa en array (aCGH)

El aCGH detecta variaciones en el número de copias (CNV) en todo el genoma con resolución de 5 kb a 100 kb (Strachan & Read, 2019). El principio es:

1. ADN del paciente (marcado con Cy5, rojo) y ADN de referencia (marcado con Cy3, verde) se co-hibridan en un array de miles de sondas de oligonucleótidos que mapean el genoma.

2. La razón Cy5/Cy3 en cada sonda refleja el número relativo de copias: razón de 1 indica número normal; >1 indica ganancia; <1 indica deleción.

3. El software (NEXUS, CytoSure) segmenta las razones a lo largo del genoma para identificar regiones de ganancia o pérdida.

Aplicaciones: diagnóstico de síndromes de microdeleción/microduplicación no detectables por cariotipo (síndrome de DiGeorge 22q11.2, deleción 1p36, Williams 7q11.23); detección de CNV en trastornos del neurodesarrollo (TEA, DI); análisis de número de copias en tumores.

14.5.2 SNP-array

El SNP-array usa sondas para millones de SNP distribuidos en el genoma; además del número de copias, informa sobre la genotipificación alélica (AA, AB, BB en cada SNP) (Nussbaum et al., 2016):

Ventaja sobre aCGH: detecta disomía uniparental (UPD) —regiones donde el número de copias es normal pero ambos alelos provienen del mismo progenitor— por pérdida de heterocigosidad (LOH) sin cambio en la dosis génica.

Aplicación en impronta: la UPD de 15q11-q13 causa PWS (UPD materna) o Angelman (UPD paterna), que el SNP-array puede identificar sin necesidad de estudios de metilación específicos.

Oncología: regiones de LOH sin pérdida de copia corresponden a mutaciones bialélicas en genes supresores por segunda vía distinta a deleción (p.ej. conversión génica mitótica).

14.6 Secuenciación de nueva generación (NGS): flujo de trabajo

14.6.1 Preparación de librería

La preparación de la librería convierte el ADN genómico en un conjunto de fragmentos adaptados para la plataforma de secuenciación (Alberts et al., 2022):

1. **Fragmentación:** sonicación (Covaris) o fragmentación enzimática a fragmentos de 150 bp a 400 bp.

2. **Reparación de extremos y adenilación** en 3'.

3. **Ligación de adaptadores:** secuencias de ADN universal que contienen el código de barras del paciente (*index*), el sitio de unión al flujo celular y los *primer* sites.

4. **Enriquecimiento:** captura por hibridación con sondas (paneles de genes o exoma) o amplificación por PCR (paneles de amplicones).

5. **Control de calidad:** Bioanalyzer (distribución de tamaños), qPCR con sondas de adaptadores (cuantificación precisa de librería).

14.6.2 Secuenciación por síntesis (Illumina)

La plataforma Illumina (dominante en clínica) usa el principio de síntesis por reversión de terminadores (Lewin et al., 2022):

1. Los fragmentos de librería se unen al flujo celular (flow cell) por sus adaptadores; amplificación en puente (*bridge amplification*) genera colonias de clones (*clusters*).

2. Cada ciclo de secuenciación incorpora un dNTP con terminador reversible fluorescente; la imagen registra el fluoróforo incorporado en cada cluster.

3. El terminador se elimina y el ciclo se repite para el siguiente nucleótido.

4. Se generan lecturas de 75 pb a 300 pb por extremo; los ensayos paired-end producen lecturas desde ambos extremos del fragmento.

14.6.3 Análisis bioinformático

El flujo bioinformático estándar incluye (Strachan & Read, 2019):

1. **Control de calidad de lecturas:** FastQC; filtrado por calidad Phred ($Q \geq 30$, precisión 99,9 %).

2. **Alineamiento al genoma de referencia:** BWA-MEM o STAR (para ARN); genera archivo BAM.

3. **Procesamiento post-alineamiento:** eliminación de duplicados PCR (GATK MarkDuplicates); recalibración de calidad de bases (BQSR).

4. **Llamada de variantes:** GATK HaplotypeCaller (germinal), Mutect2 (somático); genera archivos VCF.

5. **Anotación y priorización:** Annovar, VEP; asignación de efecto funcional, frecuencia poblacional (gnomAD), predicciones *in silico*. 6.

Figura 34. *Flujo de trabajo del NGS clínico.* Las columnas izquierda y derecha muestran las etapas de laboratorio (húmedo) y bioinformáticas, respectivamente. La calidad del ADN de entrada determina la cobertura y la tasa de llamada de variantes. Elaboración propia basada en Strachan y Read (2019) y Alberts et al. (2022).

14.6.4 Tipos de análisis NGS clínicos

¡Importante!

Profundidad de cobertura y sensibilidad para mutaciones somáticas: para detectar variantes con VAF del 5 % en un tumor heterogéneo, se necesita una profundidad de al menos 500× (en teoría, 10 lecturas de un total de 200 deben mostrar la variante para superar el umbral estadístico). Los paneles de oncología somática usan coberturas de 500–1000×; los análisis de biopsia líquida requieren >3000× para detectar VAF del 0,1 % a 1 %. Una cobertura insuficiente genera falsos negativos clínicamente relevantes (Relling & Evans, 2015).

Tabla 26. Comparación de los principales tipos de análisis NGS en clínica.

Modalidad	Cobertura diana	Prof. típica	Aplicación
Panel de genes	20–500 genes seleccionados	500–1000×	Oncología somática (NSCLC, CCR, LMA), farmacogenómica, enfermedades monogénicas
WES (exoma)	~20000 exones codificantes (~2 % del genoma)	80–150×	Enfermedades raras sin diagnóstico, cáncer hereditario
WGS (genoma)	Genoma completo (100 %)	30–50×	Variantes estructurales, regiones no codificantes, investigación
RNA-seq	Transcriptoma completo	30–100 millones de lecturas	Fusiones génicas, expresión diferencial, splicing alternativo
Biopsia líquida (ctDNA)	Panel tumoral o WGS de baja cobertura	1000–10000×	Monitorización de respuesta, resistencia temprana, MRD

Fuente: Strachan & Read (2019) y Nussbaum et al. (2016).

Nota. WES = whole exome sequencing; WGS = whole genome sequencing; MRD = minimal residual disease; ctDNA = ADN tumoral circulante.

14.7 PCR digital (dPCR): cuantificación absoluta

14.7.1 Principio de la PCR de gotitas digitales (ddPCR)

La PCR digital divide la reacción de PCR en miles de particiones (gotitas en emulsión agua-aceite en la ddPCR de Bio-Rad), cada una

con un número estadísticamente bajo de moléculas molde (0 o 1). Después de la amplificación (Bustin et al., 2009):

Las gotitas positivas (que contenían ≥1 molécula) emiten alta fluorescencia. Las gotitas negativas permanecen sin amplificación. La concentración de moléculas se calcula mediante distribución de Poisson: $\lambda = -\ln(1 - p)$, donde p es la fracción de gotitas positivas. El resultado es una **cuantificación absoluta en copias/µL** sin necesidad de curva estándar.

La ddPCR detecta variantes con VAF <0,1 % en plasma (ADN tumoral circulante, ctDNA), superando la sensibilidad de la qPCR convencional en 100–1000 veces (Relling & Evans, 2015).

14.7.2 Aplicaciones clínicas de la ddPCR

Biopsia líquida: monitorización de carga tumoral circulante (ctDNA) en LMC (BCR-ABL1), NSCLC (EGFR T790M), cáncer de mama (PIK3CA).

Enfermedad mínima residual (MRD): detección de clonas leucémicas residuales tras tratamiento en LLA, linfoma.

Cuantificación de copias virales: CMV, EBV en pacientes inmunocomprometidos (trasplantados).

Monitorización de mosaicismo: variantes de baja frecuencia en síndromes de mosaico somático.

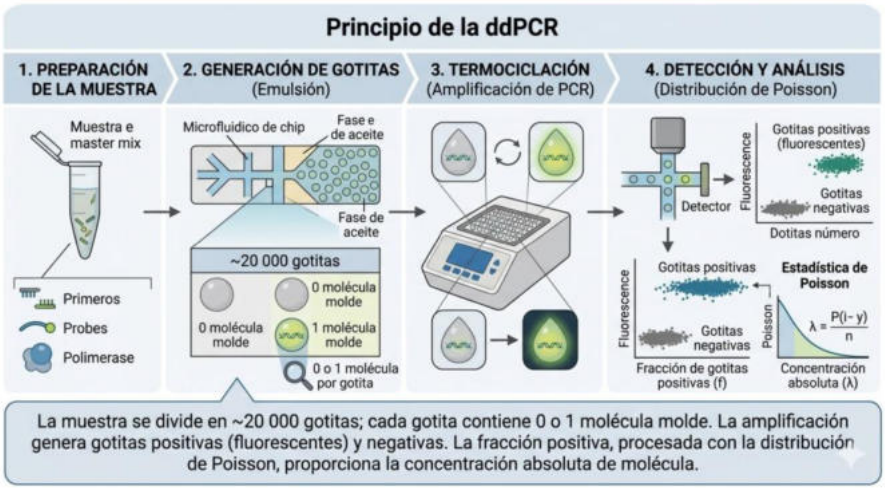


Figura 34. Principio de la ddPCR.

La muestra se divide en ~20 000 gotitas; cada gotita contiene 0 o 1 molécula molde. La amplificación genera gotitas positivas (fluorescentes) y negativas. La fracción positiva, procesada con la distribución de Poisson, proporciona la concentración absoluta de moléculas. Elaboración propia basada en Bustin et al. (2009) y Relling y Evans (2015).

14.8 CRISPR-Cas9 como herramienta de análisis y diagnóstico

El sistema CRISPR-Cas9, descrito en el capítulo 1 por su rol en inmunidad bacteriana y desarrollado como herramienta de edición genómica por Doudna y Charpentier (Jinek et al., 2012), tiene aplicaciones emergentes en diagnóstico molecular:

SHERLOCK (Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing): combina la amplificación isotérmica SHERPA con la actividad colateral de Cas13a (ARNasa), que corta ARN reportero

fluorescente al activarse. Detecta secuencias de ADN o ARN viral con sensibilidad attomolar. Aplicado al diagnóstico de Zika, Dengue y SARS-CoV-2.

DETECTR (DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter): usa Cas12a con actividad de corte colateral de ADN de simple hebra reportero; permite diagnóstico con lectura visual en tira reactiva.

Validación de variantes: CRISPR-Cas9 puede «editar» la variante de interés en células modelo para verificar su efecto funcional, un criterio PS3/BS3 en la clasificación ACMG.

¿Sabías que. . . ?

La sensibilidad del sistema SHERLOCK (attomolar = $10^{(-)18}$ mol $L^{(-)1}$) es de 5–6 órdenes de magnitud superior a la PCR convencional. Sin necesidad de termociclador, SHERLOCK puede implementarse en contextos de bajos recursos con lectura fluorescente en tira. En 2020, un laboratorio de Broad Institute publicó el diagnóstico de SARS-CoV-2 con SHERLOCK en <1 hora, con una sensibilidad comparable al RT-qPCR de referencia (Jinek et al., 2012).

14.9 MLPA: amplificación de sondas dependiente de ligación multiplex

La MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) es la técnica estándar para la detección de duplicaciones y deleciones de exones individuales en genes clínicamente relevantes (Harvey, 2019):

Principio:

1. Dos semi-sondas de oligonucleótidos hibridan en posiciones adyacentes en el ADN molde, flanqueando el exón de interés.

2. Solo si ambas semi-sondas hibridan (exón presente), una ligasa las une covalentemente.

3. La sonda ligada se amplifica por PCR con primers universales; la longitud del amplicón es característica de cada exón.

4. Electroforesis capilar separa los amplicones; la altura del pico es proporcional al número de copias del exón.

Interpretación: razón de dosis normalizada ≈1,0 = 2 copias; ≈0,5 = 1 copia (deleción heterocigota); ≈1,5 = 3 copias (duplicación heterocigota); ≈0 = 0 copias (deleción homocigota).

Aplicaciones clave: análisis de grandes deleciones en *BRCA1/2*, *DMD*, *MLH1*, *SMN1/2* (atrofia muscular espinal), *PMP22* (CMT1A, HNPP), confirmación de hallazgos de aCGH.

Aplicación para el Bioquímico Farmacéutico

MLPA y el genotipado de SMN1 en atrofia muscular espinal (AME): La AME es causada por deleción del exón 7 de *SMN1* en el 95 % de los casos. El diagnóstico por MLPA detecta la deleción y cuantifica el número de copias de *SMN2* (que produce ARNm minoritario de longitud completa). El número de copias de SMN2 predice la gravedad clínica y la elegibilidad para terapias génicas: nusinersen (oligonucleótido antisentido) y onasemnogene abeparvovec

(AAV9-SMN1) están indicados independientemente de las copias de SMN2, pero la respuesta es major con diagnosis presintomática (cribado neonatal) (Harvey, 2019).

Caso Clínico

Caso clínico 1 — Panel NGS en NSCLC: identificación de variantes accionables Contexto: Mujer de 61 años, no fumadora, adenocarcinoma pulmonar estadio IV (derrame pleural). Biopsia pleural enviada a laboratorio para panel NGS de 500 genes oncológicos.

Resultados del panel NGS (cobertura media 620×; >100× en 98,3 % de las posiciones): *EGFR* deleción exón 19 (c.2236_2250del, p.Glu746_Ala750del), VAF 68 %: **variante accionable**; sensible a osimertinib (TKI de 3.ª gen) como primera línea. *TP53* p.Arg248Gln, VAF 65 %: co-mutación frecuente en NSCLC; predictiva de menor respuesta a osimertinib en algunos estudios. *KRAS* y *ALK*: silvestres. *TMB*: 3,8 mut/Mb (baja); *PDL1*: 12 % TPS (baja).

Sin variantes germinales conocidas en genes de reparación de ADN.

Decisión terapéutica: osimertinib 80 mg d^(−)¹ como primera línea (aprobado FDA/EMA en deleción exón 19 EGFR). **Seguimiento en biopsia líquida (6 meses):** ddPCR en plasma detecta *EGFR* deleción exón 19 a VAF 0,24 % (respuesta molecular mayor). A los 18 meses: redetección a VAF 2,8 % con nueva variante *EGFR* C797S (VAF 1,1 %) →mecanismo de resistencia a osimertinib.

Preguntas de razonamiento:

1. ¿Por qué la cobertura de 620× es adecuada para detectar la variante EGFR a VAF 68 % pero insuficiente para detectar la variante C797S emergente a VAF 1,1 % en el tejido tumoral original?

2. Explique el mecanismo molecular de la resistencia adquirida mediada por EGFR C797S: ¿cómo bloquea la acción de osimertinib?

3. ¿Qué ventajas tiene la biopsia líquida con ddPCR sobre la rebiopsia de tejido para la detección de resistencia en este caso?

Concepto Clave

Jerarquía de resolución diagnóstica: Las técnicas descritas en este capítulo se distribuyen en un continuo de resolución y alcance. El cariotipo convencional (∼5 Mb) detecta aberraciones groseras; la FISH (100 kb a 200 kb) confirma loci específicos en tejido; el aCGH/SNP-array (5 kb a 100 kb) revela el paisaje genómico de CNV y UPD; el NGS en panel o exoma resuelve hasta la base individual con alta profundidad; la ddPCR cuantifica con precisión absoluta variantes de baja

frecuencia. La elección de la técnica debe alinearse con la pregunta clínica, la muestra disponible y el objetivo diagnóstico.

14.10 Actividades de Consolidación

Actividad 1 — Selección de la técnica diagnóstica adecuada

Objetivo: Para cada escenario clínico, seleccionar y justificar la técnica molecular más apropiada.

Instrucciones: Para cada caso propuesto, seleccione entre: FISH, aCGH/SNP-array, panel NGS oncológico, WES, ddPCR, MLPA, Sanger, RT-qPCR.

1. Bebé de 6 meses con retraso del desarrollo, microcefalia y hallazgos dismórficos; cariotipo normal. ¿Qué técnica identifica mejor las microdupicaciones o microdeleciones?

2. Paciente con LMC en tratamiento con imatinib; se sospecha resistencia emergente. ¿Qué técnica detecta mejor la mutación T315I a baja VAF en sangre periférica?

3. Niño de 3 años con debilidad muscular proximal progresiva; sospecha de atrofia muscular espinal. ¿Qué técnica confirma la deleción de SMN1 y cuantifica copias de SMN2?

4. Paciente de 55 años con linfoma difuso de células B grandes; tumor en biopsia ganglionar; se busca identificar todas las variantes accionables y la TMB. ¿Qué técnica es más informativa?

5. Mujer de 38 años con sospecha de síndrome de Lynch; IHQ muestra pérdida de MLH1. ¿Qué secuencia de técnicas moleculares confirma el diagnóstico?

Entregable: Tabla de técnica seleccionada + justificación (3–5 líneas por caso) + alternativa técnica con sus limitaciones.

Actividad 2 — Interpretación de un informe NGS oncológico

Objetivo: Interpretar los resultados de un panel NGS somático e identificar variantes accionables.

Instrucciones: Se proporciona un informe NGS simulado de adenocarcinoma gástrico con las siguientes variantes: *ERBB2* amplificación (razón 8.2); *TP53* p.Arg175His (VAF 71 %); *KRAS* silv.; *ARID1A* p.Gln243Ter (VAF 43 %); TMB: 22 mut/Mb; MSI: MSI-H.

1. Clasifique cada variante como accionable, probablemente accionable o sin implicación terapéutica directa actualmente.

2. Identifique los biomarcadores que predicen respuesta a inmunoterapia y a terapias anti-HER2.

3. Proponga un esquema terapéutico de primera línea basado en el perfil molecular y las terapias aprobadas.

Entregable: Tabla de clasificación de variantes + justificación terapéutica.

14.11 Preguntas de Autoevaluación

A. Selección Múltiple

1. Una sonda FISH *break-apart* para el gen *ALK* muestra señales separadas (rojas y verdes separadas) en el 28 % de los núcleos de un adenocarcinoma pulmonar. Esto indica:

a) Deleción del gen ALK en la muestra

b) Trisomía del cromosoma 2 en células tumorales

c) **Reorganización cromosómica de ALK (p.ej. EML4-ALK); resultado positivo que predice respuesta a inhibidores ALK (crizotinib, alectinib)**

d) Hibridación inespecífica de la sonda; resultado no interpretable

2. En el análisis de aCGH, una razón Cy5/Cy3 de 0,5 en una región de 3 Mb del cromosoma 5q indica:

a) Duplicación en esa región (tres copias en lugar de dos)

b) **Deleción heterocigota (una copia en lugar de dos) en esa región**

c) Metilación del ADN en la región analizada

d) Disomía uniparental de la región del cromosoma 5q

3. La ventaja del SNP-array sobre el aCGH es que:

a) Tiene mayor resolución para detectar CNV de menos de 1 kb

b) Puede secuenciar directamente la variante de nucleótido simple

c) **Detecta regiones de disomía uniparental (UPD) donde el número de copias es normal pero la genotipificación alélica muestra LOH**

d) Requiere menos ADN de partida que el aCGH

4. En la preparación de librería para NGS, los adaptadores ligados a los fragmentos de ADN sirven para:

a) Aumentar la longitud de los fragmentos para mejorar la cobertura

b) Marcar con fluoróforos los fragmentos para la detección en tiempo real

c) **Permitir la unión al flow cell de Illumina, proporcionar el código de barras de multiplexado y definir los sitios de anclaje del cebador de secuenciación**

d) Eliminar los fragmentos de ADN mitocondrial de la librería

5. La ddPCR calcula la concentración de moléculas mediante distribución de Poisson porque:

a) La PCR tiene una eficiencia exactamente del 100 % en todas las gotitas positivas

b) La fluorescencia de SYBR Green es proporcional al número de copias del amplicón en cada gotita

c) **Las moléculas se distribuyen aleatoriamente entre las gotitas; la proporción de gotitas positivas permite calcular el número de moléculas originales por la probabilidad de que una gotita tenga cero moléculas**

d) Cada gotita contiene exactamente una molécula molde

6. El sistema SHERLOCK basado en Cas13a detecta secuencias de ácidos nucleicos aprovechando:

a) La actividad de corte específico del ARN guía complementario a la diana

b) La amplificación del ADN diana con alta especificidad y sin necesidad de cebadores

c) **La actividad ARNasa colateral de Cas13a al activarse por su diana, que corta ARN reportero fluorescente de forma indiscriminada**

d) La actividad exonucleasa 5'→3' de Cas9 sobre el ADN diana hibridado

7. La MLPA detecta deleciones y duplicaciones de exones porque:

a) Secuencia directamente cada exón y compara con la referencia

b) Mide la fluorescencia de sondas FISH en núcleos interfásicos

c) La electroforesis capilar separa por tamaño fragmentos de PCR amplificados desde sondas específicas de locus cromosómico

d) **La ligación de las semi-sondas solo ocurre si el exón está presente; la altura del pico de amplificación es proporcional al número de copias del exón**

8. Para detectar la mutación EGFR T790M emergente a VAF 0,1 % en plasma de un paciente con NSCLC en tratamiento con osimertinib, la técnica más sensible es:

a) Secuenciación Sanger del exón 20 de EGFR en ADN de plasma

b) Panel NGS con cobertura de 300×

c) RT-qPCR con sonda TaqMan específica de T790M

d) **ddPCR con sonda TaqMan de T790M, que detecta VAF** <0,1 %

B. Verdadero o Falso

1. **Afirmación:** El análisis de aCGH puede detectar translocaciones equilibradas entre dos cromosomas (p.ej. t(9;22) Philadelphia) porque compara el número de copias entre paciente y referencia.

Respuesta: **Falso.** Las translocaciones equilibradas (sin ganancia ni pérdida de material genómico) no alteran el número de copias en ninguno de los cromosomas involucrados; por tanto, la razón Cy5/Cy3 del aCGH permanece en 1.0 en ambos puntos de fusión. El aCGH no detecta translocaciones equilibradas. Para su detección se requieren FISH con sondas específicas, RNA-seq (que detecta el transcrito de fusión) o WGS con detección de variantes estructurales (Nussbaum et al., 2016).

2. **Afirmación:** En NGS, una mayor profundidad de cobertura siempre mejora la calidad del análisis, por lo que es preferible usar la mayor cobertura posible independientemente del tipo de análisis.

Respuesta: **Falso.** La cobertura óptima depende del objetivo clínico. Para variantes germinales heterocigotas, 30–50× (WGS) o 100–150× (WES) son suficientes. El costo aumenta linealmente con la cobertura. Coberturas muy altas (>2000×) en variantes germinales no aportan valor diagnóstico adicional. Solo en biopsia líquida (ctDNA con VAF baja) o en detección de variantes somáticas a baja frecuencia es imprescindible la alta cobertura (Strachan & Read, 2019).

3. **Afirmación:** La biopsia líquida (análisis de ctDNA en plasma) puede reemplazar completamente la biopsia de tejido en el diagnóstico inicial de un tumor sólido, dado que ofrece mayor sensibilidad y es menos invasiva.

Respuesta: **Falso.** La biopsia líquida tiene sensibilidad reducida en estadios tempranos (baja carga tumoral, poco ctDNA circulante) y no puede revelar la histología, la arquitectura tumoral ni la heterogeneidad espacial dentro del tumor. Es complementaria, no sustituta, de la biopsia de tejido para el diagnóstico inicial. Su mayor valor es en la monitorización de respuesta y en la detección de resistencia emergente, donde es superior a la rebiopsia de tejido por su accesibilidad y la posibilidad de muestreo seriado (Relling & Evans, 2015).

C. Análisis de Casos

1. **Caso:** Una niña de 2 años presenta retraso psicomotor severo, hipotonía y rasgos faciales dismórficos. Cariotipo 46,XX (normal). SNP-array revela una región de LOH en 15q11-q13 de 6 Mb sin cambio en el número de copias (dos copias presentes, pero ambas con genotipo homocigoto: AA en todos los SNP de la región).

Preguntas:

a) ¿Qué mecanismo genético explica el hallazgo de LOH sin pérdida de copia en 15q11-q13, y cuál es el diagnóstico más probable?

b) ¿Qué estudio de metilación confirmaría el diagnóstico diferencial entre síndrome de Prader-Willi (UPD materna) y síndrome de Angelman (UPD paterna)?

c) ¿Por qué el cariotipo convencional y el aCGH (sin información alélica) no habrían detectado esta anomalía?

2. **Caso:** Un laboratorio de oncología molecular recibe una muestra de adenocarcinoma de colon con biopsia FFPE. El panel NGS de 150 genes reporta: *APC* p.Arg1450Ter (VAF 82 %), *KRAS* G12C (VAF 74 %), *TP53* p.Arg273Cys (VAF 78 %), deleción CNV de *SMAD4* (homocigota). MSS (estable en microsatélites). TMB: 5,2 mut/Mb. **Preguntas:**

a) ¿Son relevantes las altas VAF (>70 %) en este tumor para predecir respuesta al tratamiento, o la VAF absoluta importa menos que el tipo de variante?

b) La mutación KRAS G12C es especial porque tiene inhibidores aprobados (sotorasib, adagrasib). ¿Cómo afecta la presencia de *APC* Ter y *TP53* Cys a la probable eficacia de un inhibidor KRAS?

c) ¿Qué estrategia de monitorización molecular en biopsia líquida proposdría para este paciente durante el tratamiento con un inhibidor KRAS?

14.12 Glosario

aCGH Hibridación genómica comparativa en array (*array comparative genomic hybridization*); detecta ganancias y pérdidas de material genómico (CNV) con resolución de 5–100 kb co-hibridando ADN de paciente y referencia en un array de miles de sondas.

Biopsia líquida Análisis de biomarcadores derivados del tumor en fluidos corporales (ADN tumoral circulante ctDNA, células tumorales circulantes, ARN en exosomas en plasma); permite monitorizar la carga tumoral y detectar resistencias sin rebiopsia de tejido.

CNV (Copy Number Variation) Variación en el número de copias de un segmento del genoma respecto al valor diploide normal; puede ser ganancia (duplicación, amplificación) o pérdida (deleción) y abarca desde kilobases hasta megabases.

Cobertura (profundidad) Número medio de lecturas de NGS que mapean en cada posición del genoma; expresada en «x». Mayor cobertura permite detectar variantes de menor frecuencia alélica.

ctDNA ADN tumoral circulante; fragmentos de ADN del tumor (de 150– 200 pb) presentes en el plasma por necrosis/apoptosis de células tumorales; fuente para biopsia líquida.

ddPCR PCR digital de gotitas (*droplet digital PCR*); divide la reacción en ∼20 000 gotitas y cuantifica absolutamente las moléculas mediante distribución de Poisson; detecta VAF <0.1 %.

FISH Hibridación fluorescente in situ; detecta y localiza secuencias genómicas específicas en cromosomas o núcleos usando sondas de ADN marcadas fluorescentemente; resolución 100–200 kb.

Librería NGS Conjunto de fragmentos de ADN adaptados (con adaptadores ligados) listos para ser secuenciados en una plataforma de NGS.

LOH Pérdida de heterocigosidad; región genómica donde una de las dos copias se ha perdido o inactivado; en SNP-array puede ser detectada como homocigosidad sin cambio en número de copias (UPD) o con pérdida de copia (deleción).

MLPA Amplificación de sondas dependiente de ligación multiplex; cuantifica el número de copias de exones individuales con resolución de exón único; detecta grandes deleciones y duplicaciones en genes clínicamente relevantes.

NGS Secuenciación de nueva generación; plataformas de secuenciación masiva paralela que producen millones de lecturas simultáneamente; incluye paneles de genes, WES y WGS.

SNP-array Array de genotipificación de polimorfismos de nucleótido único; además del número de copias, informa sobre la heterocigosidad alélica, permitiendo detectar disomías uniparentales.

UPD (disomía uniparental) Presencia de dos copias del mismo cromosoma o segmento cromosómico provenientes del mismo progenitor; puede causar enfermedades por impronta si afecta regiones improntadas (p.ej. 15q11-q13).

VAF (variant allele fraction) Proporción de lecturas de NGS que contienen la variante respecto al total de lecturas en esa posición; refleja la fracción de células tumorales con la mutación en la muestra.

WES / WGS Whole exome sequencing / whole genome sequencing; análisis NGS de los exones codificantes del genoma (~2 %) o del

genoma completo, respectivamente; WES cubre el 85 % de las mutaciones patogénicas conocidas a 1 10 del costo de WGS.

14.13 Resumen

Las técnicas citogenéticas y moleculares avanzadas extienden la resolución del diagnóstico genético desde las aberraciones visibles al microscopio hasta variantes individuales y eventos de baja frecuencia. La FISH (resolución 100–200 kb) detecta loci específicos directamente en tejido, siendo imprescindible para la detección de fusiones oncogénicas (BCR-ABL1, EML4-ALK, PML-RARA) y amplificaciones (HER2) con aplicación inmediata en la selección de terapias dirigidas. Los arrays cromosómicos —aCGH para CNV y SNP-array para CNV + LOH/UPD— revelan el paisaje de alteraciones del número de copias a escala genómica, siendo el estándar diagnóstico en síndromes de microdeleción y trastornos del neurodesarrollo.

La NGS ha transformado el diagnóstico oncológico y genético: la preparación de librería, la secuenciación por síntesis en flow cell y el análisis bioinformático (alineamiento, llamada de variantes, anotación, clasificación ACMG) generan perfiles genómicos comprensivos en un solo experimento. La elección entre panel, WES o WGS depende de la cobertura requerida, el costo y la pregunta clínica. La cobertura adecuada —>500× para variantes somáticas— es crítica para detectar variantes de baja VAF en tumores heterogéneos. La ddPCR añade la dimensión de cuantificación ultrasensible (VAF <0.1 %) para biopsia líquida, monitorización de MRD y detección de resistencia emergente, superando a la qPCR en varios órdenes de magnitud. Tecnologías

emergentes como SHERLOCK/DETECTR (basadas en CRISPR) prometen diagnósticos rápidos y portables para patógenos y variantes de punto único con sensibilidad comparable a los estándares de referencia. La MLPA completa el arsenal con la detección precisa de deleciones y duplicaciones de exones individuales, esencial para el diagnóstico de DMD, AME, BRCA y síndromes de Lynch.

CAPÍTULO XV

15 BIOMARCADORES, DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y ROL DEL BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Los catorce capítulos precedentes han construido un edificio conceptual que va desde la estructura molecular del ADN hasta los sistemas de diagnóstico genómico más avanzados. Este capítulo final integra ese conocimiento en el contexto de la práctica profesional del bioquímico farmacéutico: los biomarcadores moleculares como instrumentos de diagnóstico, pronóstico y predicción terapéutica; los principios de validación y aplicación clínica; el diagnóstico prenatal e implantacional; y el rol específico del BQF en el laboratorio de biología molecular, en la consulta farmacogenómica y en el desarrollo de nuevas terapias. Este capítulo es el puente entre el conocimiento y la acción profesional.

15.1 Introducción

Un biomarcador (*biomarker*) es una característica biológica objetivamente medible que refleja el estado fisiológico o patológico de un organismo, la respuesta a una intervención terapéutica o el riesgo de desarrollar una enfermedad (Alberts et al., 2022). Los biomarcadores moleculares —basados en ADN, ARN, proteínas o metabolitos— han transformado la práctica médica: permiten estratificar pacientes para el tratamiento más efectivo, monitorizar la respuesta con precisión molecular y detectar enfermedades en estadios subclínicos.

El consenso de la FDA/NIH Biomarker Working Group clasifica los biomarcadores en siete categorías funcionales: susceptibilidad/riesgo, diagnóstico, pronóstico, predictivo, respuesta farmacológica, seguridad y biomarcador sustituto (*surrogate*) (Weinshilboum & Wang, 2017). En oncología molecular, las cuatro primeras categorías son las más relevantes y frecuentemente concurren en la misma molécula: la mutación *EGFR* L858R es diagnóstica (confirma NSCLC de tipo molecular), pronóstica (se asocia a mayor supervivencia), predictiva (responde a TKI) y de seguimiento (monitorización de ctDNA).

Para el bioquímico farmacéutico de UTMACH, este conocimiento no es abstracto: en Ecuador, las enfermedades crónicas no transmisibles (cáncer, diabetes, ECV) son la primera causa de morbimortalidad. La implementación de diagnóstico molecular de calidad en los laboratorios clínicos públicos y privados del país es una necesidad urgente que requiere profesionales formados en biología molecular aplicada (Relling & Evans, 2015).

15.2 Objetivos de Aprendizaje

Clasificar los biomarcadores moleculares según su función clínica (diagnóstico, pronóstico, predictivo, de seguimiento) y aplicar esta clasificación a ejemplos concretos en oncología y enfermedades hereditarias.

Describir el proceso de validación de biomarcadores moleculares (validación analítica, clínica y utilidad clínica) y los estándares regulatorios que rigen su implementación en el laboratorio clínico.

Aplicar los principios del diagnóstico prenatal no invasivo (DPNI) y del diagnóstico genético preimplantacional (DGP) relacionando la metodología molecular con el contexto ético y clínico.

Describir el rol del bioquímico farmacéutico en la farmacogenómica clínica, identificando los fármacos de mayor relevancia y los genes que determinan su metabolismo o respuesta.

Reflexionar sobre las perspectivas futuras de la biología molecular en la práctica farmacéutica: terapia génica, ARN terapéutico y medicina de precisión.

15.3 Preguntas de Enfoque

1. ¿Cuál es la diferencia entre un biomarcador predictivo y uno pronóstico, y por qué la distinción tiene implicaciones terapéuticas cruciales?

2. ¿Qué criterios debe cumplir un biomarcador molecular para ser considerado clínicamente útil más allá de su validación analítica?

3. ¿Qué información genómica se obtiene del análisis de ADN fetal libre en plasma materno, y cuáles son sus limitaciones diagnósticas actuales?

4. ¿Por qué la farmacogenómica beneficia más a los pacientes polimedicados de edad avanzada que a los pacientes jóvenes con monoenfermedad?

5. ¿Qué desafíos éticos plantea el uso clínico rutinario del genoma completo en pacientes pediátricos?

15.4 Clasificación y validación de biomarcadores moleculares

15.4.1 Categorías funcionales de biomarcadores

Tabla 27. Categorías funcionales de biomarcadores moleculares con ejemplos en oncología y enfermedades hereditarias.

Categoría	Definición	Ejemplo
Susceptibilidad / riesgo	Predice probabilidad de desarrollar enfermedad en individuos sanos	BRCA1/2 mutación germinal (riesgo acumulado de cáncer de mama 50 % a 80 %); PRS (puntuación de riesgo poligénico) para DM2
Diagnóstico	Confirma la presencia de la enfermedad	BCR-ABL1 por FISH o RT-qPCR (LMC); FMR1 CGG-expansión (X frágil)
Pronóstico	Predice el curso natural de la enfermedad	Ki-67 en cáncer de mama; deleción 17p en LLC; IPSS-R en SMD
Predictivo	Predice la respuesta (o no respuesta) a un tratamiento específico	EGFR L858R → respuesta a osimertinib; KRAS WT → respuesta a cetuximab; MSI-H → respuesta a pembrolizumab
Monitorización (farmacodinámico)	Mide el efecto biológico de un tratamiento in vivo	BCR-ABL1 % IS (LMC bajo imatinib); ctDNA en plasma (carga tumoral)
Seguridad / toxicidad	Predice riesgo de reacción adversa	HLA-B*57:01 → hipersensibilidad a abacavir; TPMT/NUDT15 → toxicidad por tiopurinas
Sustituto (surrogate)	Reemplaza un endpoint clínico difícil de medir	Carga viral en VIH como sustituto de CD4+/mortalidad

Fuente: Weinshilboum & Wang (2017) y Relling & Evans (2015).

Nota. LMC = leucemia mieloide crónica; LLC = leucemia linfocítica crónica; SMD = síndrome mielodisplásico; DM2 = diabetes mellitus tipo 2.

15.4.2 Validación de biomarcadores: etapas y estándares

La introducción de un biomarcador en la práctica clínica requiere tres etapas de validación (Harvey, 2019; Strachan & Read, 2019):

1. **Validación analítica:** demuestra que el ensayo mide lo que pretende medir con precisión, exactitud, reproducibilidad, sensibilidad analítica (LOD, LOQ) y especificidad analítica adecuadas. Implica la caracterización del intervalo de medición, interferentes y estabilidad de la muestra.

2. **Validación clínica:** demuestra que el biomarcador está asociado con el resultado clínico de interés (enfermedad, respuesta, pronóstico) en estudios prospectivos o retrospectivos con suficiente poder estadístico. Métricas: sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, curva ROC, hazard ratio.

3. **Utilidad clínica:** demuestra que el uso del biomarcador mejora los resultados para los pacientes (reduce mortalidad, toxicidad o costo) en comparación con la práctica estándar sin el biomarcador. Es la etapa más difícil y la más exigida por las agencias regulatorias (FDA, EMA, INVIMA en Colombia, ARCSA en Ecuador).

Concepto Clave

La validación analítica garantiza la calidad técnica del ensayo; la validación clínica garantiza su relevancia biológica; la utilidad clínica garantiza que su uso beneficia al paciente. Un biomarcador puede ser analíticamente impecable y clínicamente validado, pero sin utilidad si su resultado no cambia la decisión terapéutica. Los tres niveles son obligatorios para la adopción en guías clínicas.

15.5 Biomarcadores oncológicos moleculares: diagnóstico y selección terapéutica

15.5.1 Del diagnóstico histológico al perfil molecular

La oncología del siglo XXI ha transitado del diagnóstico por histología (órgano de origen) al diagnóstico por perfil molecular (vía de señalización mutada). El mismo tumor puede ahora ser tratado con el mismo fármaco independientemente del órgano de origen, si comparte la alteración molecular diana (*tumor-agnostic approval*) (Watson et al., 2014):

Larotrectinib (NTRK-agnostic): eficaz en cualquier tumor sólido con fusión NTRK1/2/3, independientemente del tejido de origen (primera aprobación tumoragnóstica, FDA 2018).

Pembrolizumab MSI-H/dMMR: eficaz en cualquier tumor sólido con deficiencia de MMR o MSI-H (FDA 2017). **Entrectinib (NTRK / ROS1):** tumores con fusiones NTRK o reordenamiento ROS1.

Este modelo requiere que el laboratorio de biología molecular identifique la alteración antes de la prescripción. El BQF en el laboratorio es el profesional que ejecuta, interpreta y reporta estos análisis.

15.5.2 Inmuno-oncología: biomarcadores de respuesta a inhibidores de puntos de control

Los inhibidores de PD-1/PD-L1 (pembrolizumab, nivolumab, atezolizumab) han transformado el tratamiento del cáncer. Tres biomarcadores predicen la respuesta (Relling & Evans, 2015; Weinshilboum & Wang, 2017):

PDL1 IHQ (TPS o CPS): expresión de PD-L1 en la membrana de células tumorales (%) o en células tumorales + inmunes (CPS). Punto de corte variable por fármaco (≥1 %, ≥50 % según indicación). **MSI-H / dMMR:** detectada por IHQ (pérdida de MLH1/MSH2/MSH6/ PMS2) o por NGS/PCR multiplex (capítulo 13). TMB alta es correlacionada. **TMB (tumor mutational burden):** umbrales variables (>10 mut/Mb para pembrolizumab tumor-agnostico según FDA 2020). Calculado por panel NGS de al menos 1 Mb de región codificante.

¡Importante!

Concordancia entre IHQ y NGS para PDL1/MSI: la IHQ para PDL1 tiene variabilidad significativa entre anticuerpos (SP263, 22C3, 28-8) y entre laboratorios; el QC externo con esquemas de garantía de calidad (UKNEQAS, EQA CAP) es obligatorio para reportar este

biomarcador con validez diagnóstica. Para MSI, la concordancia entre IHQ y PCR pentaplex es >95 %, pero la NGS es el gold standard en tumores sin expresión de las cuatro proteínas MMR en IHQ (Harvey, 2019).

15.6 Diagnóstico prenatal no invasivo (DPNI) y preimplantacional (DGP)

15.6.1 DPNI: ADN fetal libre en plasma materno

El 5 % a 10 % del ADN libre en plasma materno es de origen fetal (ADN fetal libre, cfDNA fetal), liberado principalmente por apoptosis del trofoblasto placentario. Este ADN fetal puede detectarse desde la semana 9 a 10 de gestación y eliminarse <24 h tras el parto (Strachan & Read, 2019):

Metodología: el DPNI usa secuenciación masiva del cfDNA en plasma materno:

1. Extracción de cfDNA (plasma de 5 mL a 10 mL de sangre materna).

2. Secuenciación de genoma completo de baja cobertura (0,1–1×) o análisis dirigido de SNP cromosómicos específicos.

3. Análisis bioinformático de la distribución de lecturas por cromosoma: un exceso de lecturas del cromosoma 21 (>3 DS sobre la media) indica trisomía 21 fetal con alta probabilidad.

Rendimiento diagnóstico:

Trisomía 21: sensibilidad >99 %; especificidad >99,9 %; VPP depende de la prevalencia (edad materna, riesgo combinado). Trisomía 18 y 13: sensibilidad >95 %. Monosomía X (Turner): sensibilidad >90 %. Microdelecionnes (<1 Mb): en desarrollo; requiere mayor cobertura.

Limitaciones: no es diagnóstico (es un test de cribado); resultado positivo requiere confirmación por amniocentesis o biopsia de vellosidades coriales. No detecta todas las anomalías estructurales ni todas las enfermedades monogénicas.

15.6.2 Diagnóstico genético preimplantacional (DGP)

El DGP analiza el material genético de embriones obtenidos por fertilización in vitro antes de la transferencia uterina (Nussbaum et al., 2016):

DGP-A (aneuploidías): análisis de los 24 cromosomas mediante NGS o aCGH de biopsia de trofoblasto (estadio de blastocisto, día 5). Reduce la tasa de aborto y aumenta la tasa de implantación seleccionando embriones euploides.

DGP-M (enfermedades monogénicas): análisis de mutaciones específicas (FQ, DMD, Huntington, BRCA) por PCR altamente sensible (whole genome amplification + PCR alelo-específica) para seleccionar embriones no afectados.

El bioquímico farmacéutico participa en la validación de los protocolos de PCR para DGP-M y en el control de calidad del análisis de cfDNA para DPNI.

¿Sabías que. . . ?

El primer bebé diagnosticado con DGP nació en el Reino Unido en 1990 para evitar la X-frágil (DGP de sexo). Hoy, el DGP-M está disponible para más de 200 enfermedades monogénicas. La plataforma Karyomapping, basada en NGS de SNP de genoma completo, permite simultáneamente el DGP-A y el DGP-M en una sola biopsia de blastocisto, lo que ha simplificado enormemente el proceso (Strachan & Read, 2019).

15.7 Farmacogenómica clínica: el bioquímico farmacéutico en la medicina de precisión

15.7.1 Principios de farmacogenómica

La farmacogenómica estudia cómo las variantes genéticas influyen en la respuesta a los fármacos —eficacia, dosis y toxicidad— (Relling & Evans, 2015). Los genes más relevantes son los de las enzimas que metabolizan fármacos (CYP450, UGT, TPMT, NUDT15, DPYD) y los transportadores e dianas farmacológicas.

Tabla 28. Pares gen-fármaco de mayor relevancia clínica en farmacogenómica.

Gen	Fármaco / clase	Efecto de la variante	Recomendación CPIC
CYP2C9 + VKORC1	Warfarina	Variantes *2, *3 (CYP2C9) y -1639A (VKORC1) reducen metabolismo y aumentan sensibilidad	Reducir dosis inicial; usar calculadoras de dosis farmacogenómica
CYP2C19	Clopidogrel	*2 (PM) → fármaco no	PM: usar prasugrel o

		activado; riesgo de eventos cardiovasculares	ticagrelor como alternativa
CYP2D6	Codeína, tamoxifeno, antidepresivos	PM: acumulación de fármaco/toxicidad; UM: falta de eficacia	Codeína contraindicada en PM y UM; ajustar antidepresivos
TPMT / NUDT15	Tiopurinas (azatioprina, 6-MP, tioguanina)	Déficit → acumulación de TGN; mielotoxicidad grave	Genotipado obligatorio antes de iniciar; reducir dosis en heterocigotos
DPYD	5-fluorouracilo, capecitabina	*2A, *13, HapB3 → déficit de DPD; toxicidad grave por 5-FU	Genotipado antes de quimioterapia; reducir dosis 50 % en heterocigotos
HLA-B57:01*	Abacavir (VIH)	Alelo B*57:01 → hipersensibilidad grave (reacción de hipersensibilidad)	Test obligatorio antes de prescribir; contraindicado si positivo
HLA-A31:01*	Carbamazepina	Alelo A*31:01 → síndrome de Stevens-Johnson (poblaciones asiáticas)	Genotipado antes de iniciar en poblaciones de riesgo
UGT1A1	Irinotecán, belinostat	*28 (TA7) → déficit glucuronidación de SN-38; diarrea y neutropenia	Reducir dosis en homocigotos *28/*28

Fuente: Relling & Evans (2015) y Weinshilboum & Wang (2017).

Nota. PM = metabolizador pobre; UM = metabolizador ultrarrápido; TGN = nucleótidos de tioguanina; DPD = dihidropirimidina deshidrogenasa.

15.7.2 El bioquímico farmacéutico como especialista en farmacogenómica

El CPIC (*Clinical Pharmacogenomics Implementation Consortium*) publica guías detalladas de implementación para más de 25 pares gen-fármaco, traduciendo los resultados del genotipado en recomendaciones de prescripción específicas (Relling & Evans, 2015). El BQF en el laboratorio de farmacogenómica:

1. **Ejecuta y valida** los ensayos de genotipado: PCR alelo-específica, RT-ARMS, o paneles NGS farmacogenómicos.

2. **Genera e interpreta** el informe de variantes en el contexto de las guías CPIC/DPWG.

3. **Asesora** al clínico y al farmacéutico hospitalario sobre el ajuste de dosis o la selección del fármaco alternativo.

4. **Monitoriza** las concentraciones plasmáticas del fármaco (TDM) para correlacionar el fenotipo metabólico con los niveles séricos.

Aplicación para el Bioquímico Farmacéutico

Implementación de un panel farmacogenómico preventivo (PGx) en el contexto ecuatoriano: un panel PGx de 12 genes (CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4/5, TPMT, NUDT15, DPYD, SLCO1B1, UGT1A1, HLA-B, VKORC1, F5) realizado una sola vez en la vida cubre las decisiones terapéuticas de mayor impacto. El costo actual de un panel NGS farmacogenómico ($200–500) es inferior al costo de hospitalización por toxicidad severa (neutropenia febril:

>$1000 /día). El BQF de UTMACH capacitado en farmacogenómica puede liderar la implementación de estos paneles en el sistema de salud público ecuatoriano, alineándose con el modelo de salud preventivo del Ministerio de Salud Pública del Ecuador (Relling & Evans, 2015; Weinshilboum & Wang, 2017).

15.8 Terapias avanzadas: ARN terapéutico y terapia génica

15.8.1 Oligonucleótidos terapéuticos

Los oligonucleótidos antisentido (ASO), los ARNi/siARN y los ARNm terapéuticos constituyen una nueva generación de fármacos «informacionales» que actúan a nivel del ARN (Harvey, 2019):

ASO: cadenas cortas de ADN/ARN modificado (fosfotionato, LNA, 2'-MOE) que hibridan con el ARNm diana e inducen su degradación por RNasa H o modulan el splicing. Aprobados: nusinersen (SMN2-ASO en AME), eplontersen (TTR-ASO en polineuropatía hereditaria por transtiretina), eteplirsen (skip exón 51 en DMD). **siARN conjugado con GalNAc:** dirección hepática por receptor de asialoglucoproteína. Inclisiran (siARN de PCSK9, inyección semestral); givosiran (ALAS1-siARN en porfiria aguda).

ARNm terapéutico: incorporado en nanopartículas lipídicas (LNP). Las vacunas COVID-19 (BNT162b2, mRNA-1273) demostraron la viabilidad clínica a escala masiva. Aplicaciones futuras: terapia de sustitución proteica transitoria, oncología (ARNm de neoantígenos tumorales).

15.8.2 Terapia génica y edición genómica

La terapia génica introduce material genético funcional en células del paciente para corregir un defecto o conferir una función nueva (Harvey, 2019):

Vectores virales: AAV (adeno-asociado): baja inmunogenicidad, no integra (episomal); usado en AME (onasemnogene), distrofia retiniana (voretigene), hemofilia A/B. Lentiviral: integra en el genoma; permite corrección permanente en células en división (LMC, talasemia: betibeglogene).

Terapia ex vivo con CAR-T: linfocitos T del paciente modificados lentiviralmente para expresar un receptor quimérico de antígeno (CAR) específico de CD19 (axicabtagene, tisagenlecleucel en LLA y linfoma difuso B) o de BCMA (en mieloma múltiple).

CRISPR-Cas9 en clínica: exa-cel (exagamglogene autotemcel, FDA 2023): edición ex vivo de células madre hematopoyéticas para reactivar la γ-globina (HbF) en drepanocitosis y β-talasemia. Primera terapia CRISPR aprobada para uso humano.

Concepto Clave

La aprobación de exa-cel (terapia CRISPR) en diciembre de 2023 marca el inicio de una nueva era de medicina molecular: la edición permanente del genoma como tratamiento. Para el bioquímico farmacéutico, estas terapias generan nuevas demandas de control de calidad (verificación de la edición, ausencia de edición fuera de diana),

de logística de manufactura (terapias autólogas, centros especializados) y de farmacovigilancia post-comercialización.

15.9 El rol del bioquímico farmacéutico en el ecosistema de la medicina molecular

El bioquímico farmacéutico moderno actúa en múltiples espacios del ecosistema de la medicina molecular (Weinshilboum & Wang, 2017):

Competencias específicas del BQF de UTMACH:

Extracción, control de calidad y almacenamiento de muestras biológicas para diagnóstico molecular (sangre, tejido, biopsia líquida). Realización e interpretación de PCR convencional, RT-qPCR, ddPCR y análisis de fragmentos (STR) en el contexto clínico. Participación en el análisis de datos de NGS: desde la verificación de la cobertura hasta la interpretación básica de variantes con clasificación ACMG/AMP.

Espacios de acción del BQF en medicina molecular

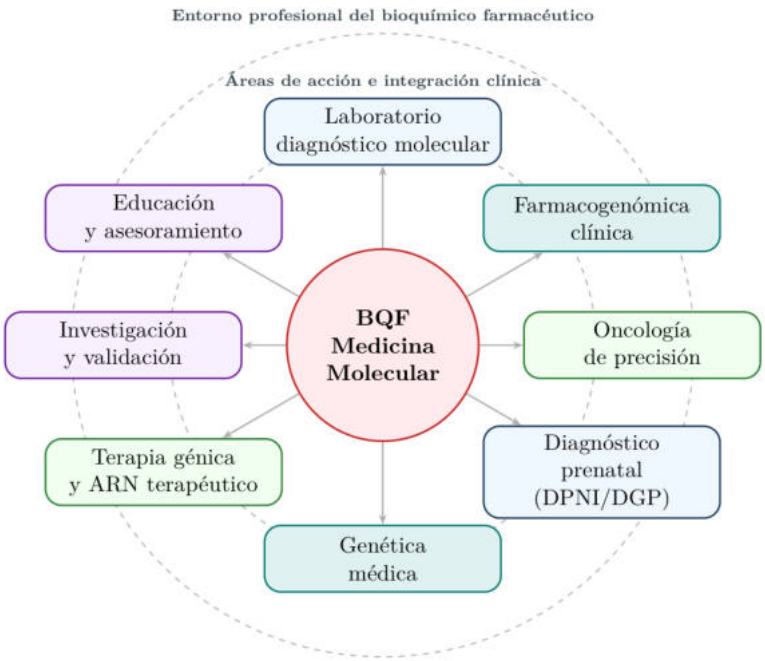


Figura 35. Roles del bioquímico farmacéutico en el ecosistema de la medicina molecular.

El BQF actúa como nexo técnico entre el diagnóstico genómico, la farmacoterapia de precisión y la investigación biomédica, integrando competencias de laboratorio, bioinformática y asesoramiento clínico. Elaboración propia basada en Relling y Evans (2015) y Weinshilboum y Wang (2017).

Asesoramiento farmacogenómico en el marco de las guías CPIC: de la variante al ajuste de dosis. Control de calidad interno (CCI) y externo (CCE/EQA) de los ensayos del laboratorio molecular. Conocimiento de la normativa vigente: ISO 15189 (laboratorios médicos), ISO 15190 (bioseguridad), regulaciones ARCSA/MSP para diagnóstico molecular en Ecuador.

Caso Clínico

Caso clínico 1 — Implementación de un panel farmacogenómico preoperatorio en paciente con cáncer de colon Contexto: Hombre de 64 años, adenocarcinoma de colon estadio III (pT3N1M0). Programado para quimioterapia adyuvante con FOLFOX (oxaliplatino + fluorouracilo + leucovorin) + cetuximab. **Panel farmacogenómico pre-tratamiento (realizado por el BQF del laboratorio):**

DPYD c.1905+1G>A (alelo *2A): **heterocigoto** →déficit parcial de DPD.

Riesgo de toxicidad grave por 5-FU (neutropenia, mucositis grado 3–4, síndrome mano-pie). *UGT1A1* *28/*1: heterocigoto →metabolismo intermedio de irinotecán (no prescrito en este caso, pero relevante para líneas siguientes). *KRAS/NRAS/BRAF* en tumor (NGS): *KRAS* silv., *NRAS* silv., *BRAF* silv. →elegible para cetuximab (anti-EGFR). *MSI*: MSS →baja probabilidad de respuesta a pembrolizumab.

Recomendación BQF (siguiendo guía CPIC DPYD 2018): Reducción de dosis inicial de fluorouracilo al 50 % de la dosis estándar en heterocigotos DPYD *2A. Monitorización estrecha de toxicidad en ciclo 1; posibilidad de titulación de dosis al alza si tolerancia adecuada.

Resultado: El oncólogo inicia con 5-FU al 50 %. El paciente tolera adecuadamente (toxicidad grado 1). La dosis se titula al 75 % en ciclo 2. Sin hospitalización por toxicidad durante los 6 ciclos de FOLFOX. El informe farmacogenómico del BQF fue incluido en la historia clínica electrónica.

Preguntas de razonamiento:

1. ¿Qué consecuencias podría haber tenido la administración de la dosis estándar de 5-FU a este paciente sin el genotipado de DPYD previo?

2. Explique el mecanismo enzimático por el que la variante DPYD *2A lleva a la acumulación de 5-FU y a su toxicidad.

3. ¿Qué implicación tendría si el resultado de KRAS hubiera sido KRAS G12D (mutante) para la elección de cetuximab?

Concepto Clave

El hilo conductor del libro: desde la estructura del ADN (capítulo 2) hasta la terapia génica con CRISPR (capítulo 15), la biología molecular es la ciencia que traduce la información genómica en decisiones terapéuticas de precisión. El bioquímico farmacéutico es el profesional que garantiza la calidad técnica de esa traducción: desde la extracción del ADN hasta el informe farmacogenómico que guía la prescripción. En Ecuador, la formación en biología molecular que ha recibido en este texto es la base para liderar la transformación del sistema diagnóstico hacia la medicina de precisión.

15.10 Actividades de Consolidación

Actividad 1 — Diseño de un programa de farmacogenómica preventiva

Objetivo: Diseñar un programa piloto de farmacogenómica preemptiva para un hospital universitario en Ecuador.

Instrucciones:

1. Seleccionar los 8 pares gen-fármaco de mayor impacto clínico para una población ecuatoriana mixta (mestiza, indígena, afrodescendiente) considerando las terapias más prescritas en el sistema de salud pública.

2. Proponer la plataforma tecnológica (PCR alelo-específica, panel NGS, o chip de genotipado) que mejor se adapte al presupuesto y capacidad técnica de un laboratorio de hospital universitario de segundo nivel.

3. Describir el flujo de trabajo del BQF: desde la recepción de la muestra hasta el informe farmacogenómico integrado en la historia clínica.

4. Identificar los requisitos de acreditación (ISO 15189) necesarios para implementar el servicio con validez diagnóstica.

Entregable: Propuesta de programa de 2 páginas con tabla de pares gen-fármaco seleccionados, plataforma propuesta, flujo de trabajo y hoja de ruta de acreditación.

Actividad 2 — Análisis ético de un caso de diagnóstico prenatal

Objetivo: Analizar las implicaciones éticas, clínicas y legales del DPNI en el contexto del sistema de salud ecuatoriano.

Instrucciones:

1. Una mujer de 38 años, segunda gestación, solicita DPNI en semana 11. El resultado reporta “alta probabilidad de trisomía 21 fetal (score

>99 %)". Identifique los pasos obligatorios de confirmación diagnóstica y asesoramiento.

2. Discuta el rol del BQF en el proceso de DPNI: ¿qué tareas son de su competencia específica y cuáles corresponden a otros profesionales?

3. Reflexione sobre el acceso al DPNI en Ecuador: ¿es equitativo? ¿Qué rol puede jugar el BQF en la democratización del diagnóstico prenatal molecular de calidad?

Entregable: Análisis escrito de 400 palabras con posición fundamentada sobre el rol del BQF en el DPNI en Ecuador.

15.11 Preguntas de Autoevaluación

A. Selección Múltiple

1. Un biomarcador predictivo se define como aquel que:

a) Predice el curso natural de la enfermedad independientemente del tratamiento recibido

b) Confirma la presencia de la enfermedad con alta sensibilidad y especificidad

c) **Predice la respuesta (o no respuesta) a un tratamiento específico en pacientes con la alteración frente a los que no la tienen**

d) Sustituye a un endpoint clínico difícil de medir en ensayos clínicos

2. El análisis de ctDNA en plasma materno (DPNI) detecta aneuploidías fetales porque:

a) El 100 % del ADN libre en plasma materno es de origen fetal

b) Los eritrocitos fetales nucleados son capturados e interrogan su genoma

c) **El ADN fetal (**5 % **a** 10 % **del cfDNA total) contribuye lecturas proporcionales a la copia del cromosoma fetal; excesos estadísticos de lecturas de un cromosoma indican trisomía**

d) La retrotranscriptasa del ARNm fetal genera ADNc detectable por PCR

3. Un paciente heterocigoto para *DPYD* *2A que requiere quimioterapia con 5-FU según guías CPIC debe:

a) Recibir la dosis estándar con monitorización estricta, sin reducción inicial

b) Contraindicar el uso de cualquier fluoropirimidina de por vida

c) **Reducir la dosis inicial de 5-FU al** 50 % **y titular al alza según tolerancia**

d) Sustituir el 5-FU por irinotecan sin ajuste de dosis

4. La primera terapia génica basada en CRISPR-Cas9 aprobada para uso humano (exa-cel, 2023) actúa:

a) Insertando el gen de β-globina funcional en células madre hematopoyéticas con vector lentiviral

b) Silenciando el gen de α-globina para reducir el desbalance en β-talasemia

c) **Editando el gen BCL11A (represor de HbF) en células madre hematopoyéticas ex vivo para reactivar la expresión de γ-globina y producción de hemoglobina fetal**

d) Corrigiendo directamente la mutación HBB Glu6Val en drepanocitosis por corrección de base

5. La validación clínica de un biomarcador es distinta de la validación analítica porque:

a) Evalúa la precisión y exactitud del ensayo con estándares certificados

b) Determina el rango dinámico, LOD y LOQ del método de detección

c) **Demuestra la asociación estadística del biomarcador con el resultado clínico de interés (respuesta, supervivencia, diagnóstico) en estudios con pacientes**

d) Verifica la estabilidad de la muestra bajo diferentes condiciones de almacenamiento

6. El fármaco larotrectinib recibió la primera aprobación «tumor-agnóstica» de la FDA porque:

a) Es efectivo en todos los tumores sólidos independientemente de cualquier alteración genómica

b) Tiene el perfil de seguridad más favorable de todos los inhibidores de quinasa disponibles

c) **Es efectivo en cualquier tumor con fusión NTRK1/2/3 independientemente del órgano de origen, siendo la fusión NTRK el biomarcador predictivo**

d) Es el primer fármaco dirigido a un gen supresor de tumores (NTRK actúa como supresor al fusionarse)

7. Las nanopartículas lipídicas (LNP) se utilizan como sistema de entrega del ARNm terapéutico (vacunas COVID-19, inclisiran) principalmente porque:

a) Integran el ARNm en el genoma celular para expresión permanente

b) Protegen el ARNm de la degradación por ARNasas plasmáticas y facilitan su entrada en las células

c) **Forman vesículas que encapsulan el ARNm, protegiéndolo de la degradación y facilitando la fusión con la membrana celular para la entrega intracelular eficiente**

d) Son virales y tienen tropismo específico para hígado o músculo

8. El CPIC (*Clinical Pharmacogenomics Implementation Consortium*) publica guías con el propósito de:

a) Estandarizar los métodos de genotipado de laboratorio para todos los genes farmacogenómicos

b) Establecer los requerimientos regulatorios mínimos para la aprobación de tests farmacogenómicos por la FDA

c) **Traducir los resultados de genotipado farmacogenómico en recomendaciones de prescripción clínica específicas, facilitando la implementación en la práctica**

d) Financiar los estudios clínicos que validan los biomarcadores farmacogenómicos en poblaciones diversas

B. Verdadero o Falso

1. **Afirmación:** Un resultado positivo de DPNI (alta probabilidad de trisomía 21) es suficiente para recomendar la interrupción voluntaria del embarazo sin estudios diagnósticos adicionales.

Respuesta: **Falso.** El DPNI es un test de cribado, no diagnóstico. Un resultado positivo tiene un valor predictivo positivo que depende de la prevalencia (edad materna, riesgo combinado del primer trimestre); puede haber falsos positivos por mosaicismo placentario confinado, variantes maternas u otros artefactos. Todo resultado positivo de DPNI debe confirmarse con una prueba diagnóstica invasiva (amniocentesis o biopsia de vellosidades coriales con cariotipo o aCGH) antes de cualquier decisión clínica. El asesoramiento genético previo y posterior al test es obligatorio (Strachan & Read, 2019).

2. **Afirmación:** La terapia génica con vector AAV proporciona una corrección permanente del defecto genético porque el transgén se integra en el genoma del huésped.

Respuesta: **Falso.** Los vectores AAV permanecen principalmente episomales (no integrados) en las células transducidas. El transgén no se transmite a las células hija en tejidos con alta proliferación (hepatocitos en niños en crecimiento), lo que significa que la expresión puede declinar con el tiempo en pediatría. En tejidos postmitóticos (neuronas, músculo maduro), la episoma persiste años o indefinidamente. Esta es una de las razones por las que la terapia génica con AAV es más duradera en adultos que en niños para ciertas indicaciones (Harvey, 2019).

3. **Afirmación:** El bioquímico farmacéutico solo tiene competencias en la fase analítica (de laboratorio) del diagnóstico molecular, no en la interpretación clínica de los resultados.

Respuesta: **Falso.** La formación del bioquímico farmacéutico incluye tanto la competencia técnica en el laboratorio como la capacidad de interpretación clínica de

los resultados moleculares en el contexto de las guías vigentes. En farmacogenómica, el BQF está específicamente capacitado para traducir el genotipo en recomendación de dosis según el CPIC. En diagnóstico oncológico molecular, participa en las reuniones de comité de tumores para discutir el perfil genómico. La distinción entre «técnico de laboratorio» y «profesional con competencia clínica» es fundamental en la diferenciación del BQF (Relling & Evans, 2015).

C. Análisis de Casos

1. **Caso:** Un hospital universitario en Cuenca (Ecuador) está evaluando implementar un panel farmacogenómico preemptivo de 12 genes para todos los pacientes oncológicos al inicio del tratamiento. El BQF a cargo debe diseñar el programa. El presupuesto disponible es limitado.
Preguntas:

a) ¿Qué 5 pares gen-fármaco priorizaría para el panel oncológico ecuatoriano y por qué, considerando los fármacos más usados en el protocolo nacional de oncología (5-FU, irinotecan, tiopurinas, platinos, rituximab)?

b) Diseñe el flujo de trabajo del laboratorio: ¿qué plataforma técnica elegiría y por qué? ¿Qué controles de calidad implementaría?

c) ¿Qué información debería contener el informe farmacogenómico que el BQF entrega al oncólogo? Proponga la estructura del informe con las secciones mínimas obligatorias.

2. **Caso:** Una mujer de 32 años con diagnóstico de drepanocitosis homocigota (HbSS) es candidata a terapia génica con exa-cel (CTX001). Es evaluada en un centro de referencia. El BQF del banco de células del hospital coordina el proceso de manufactura de la terapia.

Preguntas:

a) Explique el principio molecular de la reactivación de HbF por exacel: ¿qué gen se edita, qué tipo de edición realiza CRISPR-Cas9, y cómo resulta en producción de γ-globina?

b) ¿Qué pruebas de control de calidad del producto celular (células madre editadas) son responsabilidad del laboratorio de biología molecular antes de la infusión al paciente?

c) ¿Cuál es el rol del BQF en el seguimiento post-infusión: qué biomarcadores moleculares monitoriza a 1, 6 y 12 meses para verificar el éxito de la terapia?

15.12 Glosario

Biomarcador Característica biológica objetivamente medible que refleja un proceso biológico normal o patológico, o la respuesta a una intervención. Se clasifica en categorías funcionales: diagnóstico, pronóstico, predictivo, de seguimiento, de seguridad o sustituto.

CAR-T Linfocitos T modificados con receptor quimérico de antígeno (*chimeric antigen receptor*); reconocen un antígeno tumoral específico (CD19, BCMA) sin restricción de HLA; aprobados para leucemia linfoblástica aguda B y linfoma difuso de células B grandes.

cfDNA fetal ADN fetal libre en plasma materno, proveniente de la apoptosis del trofoblasto placentario; representa el 5 % a 10 % del cfDNA total en plasma; base del diagnóstico prenatal no invasivo (DPNI).

CPIC Clinical Pharmacogenomics Implementation Consortium; consorcio internacional que publica guías que traducen los resultados de genotipado farmacogenómico en recomendaciones de prescripción clínica específicas.

DGP Diagnóstico genético preimplantacional; análisis genético de embriones obtenidos por FIV antes de la transferencia uterina; incluye DGP-A (aneuploidías) y DGP-M (enfermedades monogénicas).

DPNI Diagnóstico prenatal no invasivo; análisis del ADN fetal libre en plasma materno a partir de la semana 9–10 de gestación para cribado de aneuploidías (trisomías 21, 18, 13, monosomía X).

LNP Nanopartícula lipídica; sistema de entrega de ARNm, siARN y otras moléculas terapéuticas basadas en ácidos nucleicos; protege el cargo del ARNm de la degradación y facilita la endocitosis celular.

Medicina de precisión Enfoque terapéutico que utiliza el perfil genómico, proteómico, epigenómico y de exposición ambiental de cada paciente para estratificar y personalizar el tratamiento.

Oligonucleótido antisentido (ASO) Cadena corta de ADN o ARN modificado que hibrida con un ARNm diana e induce su degradación por RNasa H o modula su splicing; usados en AME (nusinersen), DMD (eteplirsen) y TTR-ATTR (eplontersen).

Panel PGx preemptivo Panel de genotipado farmacogenómico realizado antes de que se prescriba cualquier fármaco, para tener la información disponible cuando se necesite en el futuro; modelo de

implementación que maximiza el valor clínico frente al genotipado reactivo.

siARN ARN de interferencia de pequeño tamaño (19 nt a 21 nt doble hebra); cargado en RISC, induce la degradación del ARNm diana; usado terapéuticamente (inclisiran, givosiran) conjugado con GalNAc para dirección hepática.

Tumor-agnóstico Aprobación de un fármaco para cualquier tipo de tumor sólido que posea una alteración molecular específica, independientemente del órgano de origen. Paradigma de oncología molecular pura: la alteración molecular define la indicación, no la histología.

Utilidad clínica Nivel más alto de validación de un biomarcador: demuestra que su uso mejora los resultados clínicos del paciente (menor mortalidad, toxicidad o costo) en comparación con la práctica sin el biomarcador; requerida para la adopción en guías clínicas.

Vector AAV Vector adeno-asociado; virus no patogénico de genoma pequeño (ssDNA, 4,7 kb) usado como vehículo de terapia génica; principalmente episomal; bajo tropismo de integración (<0,1 %); diferentes serotipos (AAV2, AAV5, AAV8, AAV9) con distintos tropismos tisulares.

15.13 Resumen

Los biomarcadores moleculares son el nexo entre el conocimiento de la biología molecular y la toma de decisiones clínicas en el siglo XXI. Su clasificación funcional —susceptibilidad, diagnóstico, pronóstico,

predictivo, farmacodinámico, de seguridad y sustituto— define su rol en el itinerario diagnóstico-terapéutico. La validación analítica (precisión, exactitud, sensibilidad), la validación clínica (asociación con el outcome) y la utilidad clínica (mejora de resultados) son las tres etapas obligatorias antes de la adopción de cualquier biomarcador en guías clínicas. El modelo tumor-agnóstico —donde la fusión NTRK o la MSI-H son las indicaciones de larotrectinib o pembrolizumab independientemente del órgano de origen— representa la culminación de la oncología molecular basada en biomarcadores.

El diagnóstico prenatal no invasivo (DPNI) con análisis de cfDNA fetal en plasma materno es el ejemplo más elocuente de la biología molecular al servicio de la medicina preventiva: detecta trisomías fetales desde la semana 9 con sensibilidad >99 % para trisomía 21, sin riesgo para el embarazo, aunque siempre como cribado que requiere confirmación diagnóstica. El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) extiende este principio a la selección de embriones con o sin alteraciones genéticas antes de la implantación uterina.

La farmacogenómica es el área donde el bioquímico farmacéutico tiene el rol más directo: el genotipado de CYP2C9/VKORC1 (warfarina), TPMT/NUDT15 (tiopurinas), DPYD (fluoropirimidinas) y HLA-B*57:01 (abacavir) previene toxicidades graves y fracasos terapéuticos con alta evidencia de utilidad clínica, respaldada por las guías CPIC. Los paneles farmacogenómicos preemptivos representan el futuro inmediato de la práctica farmacéutica personalizada.

Las terapias avanzadas —ASO, siARN, ARNm terapéutico y terapia génica (vectores AAV, CAR-T, CRISPR)— están transformando el tratamiento de enfermedades antes incurables. La aprobación de exa-cel (CRISPR para drepanocitosis/β-talasemia) en 2023 marca el inicio de la era de la edición genómica terapéutica. Para el bioquímico farmacéutico de UTMACH, el conocimiento de estos principios no es solo académico: es la base de una práctica profesional que puede transformar la calidad de vida de los pacientes ecuatorianos en las décadas venideras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts, B., Heald, R., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2022). *Molecular Biology of the Cell* (7.^(a) ed.). W.W. Norton & Company. Allis, C. D., & Jenuwein, T. (2016). The Molecular Hallmarks of Epigenetic Control. *Nature Reviews Genetics*, *17*(8), 487-500. https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59

Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, *116*(2), 281-297. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5

Bird, A. (2002). DNA Methylation Patterns and Epigenetic Memory. *Genes & Development*, *16*(1), 6-21. https://doi.org/10.1101/gad.947102

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, *55*(4), 611-622. https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797

Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell*, *40*(2), 179-204. https://doi.org/10.1016/j. molcel.2010.09.019

Collins, F. S., Morgan, M., & Patrinos, A. (2003). The Human Genome Project: Lessons from Large-Scale Biology. *Science*, *300*(5617), 286-290. https://doi.org/10.1126/science.1084564

Crick, F. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*, *227*(5258), 561-563. https://doi.org/10.1038/227561a0

Crowley, E., Nicolantonio, F. D., Loupakis, F., & Bardelli, A. (2013). Liquid Biopsy: Monitoring Cancer-Genetics in the Blood. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *10*(8), 472-484. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.110

Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The New Frontier of Genome Engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*(6213), 1258096. https://doi.org/10.1126/ science.1258096

Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*, *61*(5), 759-767. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I

Feinberg, A. P., & Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation Distinguishes Genes of Some Human Cancers from Their Normal Counterparts. *Nature*, *301*(5895), 89-92. https://doi.org/10.1038/301089a0

Fire, A. Z., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *391*(6669), 806-811. https://doi.org/10.1038/ 35888

Griffiths, A. J., Wessler, S. R., Carroll, S. B., & Doebley, J. (2020). *Introduction to Genetic Analysis* (12.^(a) ed.). W.H. Freeman and Company.

Hall, J. E., & Hall, M. E. (2020). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology* (14.^(a) ed.). Elsevier.

Harvey, R. A. (2019). *Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry* (8.^(a) ed.). Wolters Kluwer. Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993). A Novel Gene Containing a Trinucleotide Repeat That Is Expanded and Unstable on Huntington's Disease Chromosomes. *Cell*, *72*(6), 971-983. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93) 90585-E

Ingram, V. M. (1957). Gene Mutations in Human Haemoglobin: The Chemical Difference Between Normal and Sickle Cell Haemoglobin. *Nature*, *180*(4581), 326-328. https: //doi.org/10.1038/180326a0

International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome. *Nature*, *409*(6822), 860-921. https://doi.org/10. 1038/35057062

Jacob, F., & Monod, J. (1961). Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins. *Journal of Molecular Biology*, *3*(3), 318-356. https://doi.org/10.1016/ S0022-2836(61)80072-7

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, *337*(6096), 816-821. https://doi.org/10.1126/science.1225829

Jorde, L. B., Carey, J. C., & Bamshad, M. J. (2020). *Medical Genetics* (6.^(a) ed.). Elsevier.

Karp, G., Iwasa, J., & Marshall, W. (2019). *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments* (9.^(a) ed.).

John Wiley & Sons. Kerem, B.-S., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., Buchwald, M., & Tsui, L.-C. (1989). Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis. *Science*, *245*(4922), 1073-1080. https://doi.org/ 10.1126/science.2570460

Knudson Jr., A. G. (1971). Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *68*(4), 820-823. https://doi. org/10.1073/pnas.68.4.820

Kornberg, R. D. (1974). Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA. *Science*, *184*(4139), 868-871. https://doi.org/10.1126/science.184.4139.868

Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2018). *Robbins Basic Pathology* (10.^(a) ed.). Elsevier.

Lewin, B., Krebs, J. E., Goldstein, E. S., & Kilpatrick, S. T. (2022). *Lewin's Genes XIII* (13.^(a) ed.).

Jones & Bartlett Learning. Lindahl, T. (1993). Instability and Decay of the Primary Structure of DNA. *Nature*, *362*(6422), 709-715. https://doi.org/10.1038/362709a0

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., & Martin, K. C. (2021). *Molecular Cell Biology* (9.^(a) ed.). W.H. Freeman and Company. Mardis, E. R. (2011). A

Decade's Perspective on DNA Sequencing Technology. *Nature*, *470*(7333), 198-203. https://doi.org/10.1038/nature09796

Meselson, M., & Stahl, F. W. (1958). The Replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *44*(7), 671-682. https://doi. org/10.1073/pnas.44.7.671

Metzker, M. L. (2010). Sequencing Technologies — the Next Generation. *Nature Reviews Genetics*, *11*(1), 31-46. https://doi.org/10.1038/nrg2626

Modrich, P. (2006). Mechanisms in Eukaryotic Mismatch Repair. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(41), 30305-30309. https://doi.org/10.1074/jbc.R600022200

Montes, A. M. S., Borunda, J. A., & Rodríguez, A. S. (2016). *Biología Molecular: Fundamentos y Aplicación Clínica*. McGraw-Hill Interamericana. Mullis, K. B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, *262*(4), 56-65. https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2021). *Lehninger Principles of Biochemistry* (8.^(a) ed.). W.H. Freeman and Company.

Nirenberg, M. W., & Matthaei, J. H. (1961). The Dependence of Cell-Free Protein Synthesis in *E. coli* upon Naturally Occurring or Synthetic Polyribonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *47*(10), 1588-1602. https: //doi.org/10.1073/pnas.47.10.1588

Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., & Willard, H. F. (2016). *Thompson & Thompson Genetics in Medicine* (8.^(a) ed.). Elsevier/Saunders.

Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segraves, R., Lucas, J., & Gray, J. (1989). Fluorescence In Situ Hybridization with Human Chromosome-Specific Libraries: Detection of Trisomy 21 and Translocations of Chromosome 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(22), 8845-8849. https://doi.org/10.1073/pnas.86.22.8845

Pinkel, D., Straume, T., & Gray, J. W. (1986). Cytogenetic Analysis Using Quantitative, High-Sensitivity, Fluorescence Hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *83*(9), 2934-2938. https://doi.org/10.1073/pnas.83.9.2934

Relling, M. V., & Evans, W. E. (2015). Pharmacogenomics in the Clinic. *Nature*, *526*(7573), 343-350. https://doi.org/10.1038/nature15817

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, *17*(5), 405-424. https://doi.org/10.1038/gim.2015.30

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA Sequencing with ChainTerminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *74*(12), 5463-5467. https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463

Shaffer, L. G., McGowan-Jordan, J., & Schmid, M. (Eds.). (2020). *ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020)*. Karger.

Southern, E. M. (1975). Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, *98*(3), 503-517. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(75)80083-0

Strachan, T., & Read, A. P. (2019). *Human Molecular Genetics* (5.^(a) ed.). Garland Science / CRC Press.

Turnpenny, P. D., Ellard, S., & Cleaver, R. (2022). *Emery's Elements of Medical Genetics and Genomics* (16.^(a) ed.). Elsevier.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., & Chen, L. (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science*, *291*(5507), 1304-1351. https://doi.org/10.1126/science.1058040

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer Genome Landscapes.

Science, *339*(6127), 1546-1558. https://doi.org/10.1126/science.1235122

Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. M. (2014). *Molecular Biology of the Gene* (7.^(a) ed.). Pearson / Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, *171*(4356), 737-738. https: //doi.org/10.1038/171737a0

Weinshilboum, R. M., & Wang, L. (2017). Pharmacogenomics: Precision Medicine and Drug Response. *Mayo Clinic Proceedings*, *92*(11), 1711-1722. https://doi.org/10. 1016/j.mayocp.2017.09.001

Fundamentos de biología molecular en bioquímica y farmacia: Genética molecular, regulación génica y aplicaciones diagnósticas,
se publicó en el mes de noviembre de 2026.

ISBN: 978-9907-852-17-2

Grupo Editorial BLR
Ecuador
Cel: +593 98 320 4362
https://grupoblr.com/
publicaciones@grupoblr.com

BIOGRAFÍA DE AUTORES

Lidia Elizabeth Guzmán Heras:
Es Bioquímica Farmacéutica por la Universidad Técnica de Machala. Posee el título de Máster Universitario en Medicamentos, Salud y Sistema Sanitario por la Universidad de Barcelona, y actualmente cursa una maestría en Educación con mención en Investigación en Educación en la Universidad Técnica de Machala. Asimismo, cuenta con formación doctoral en Biología Molecular y Biomedicina.

Ronald Andreé Vitonera Rogel:
Médico veterinario zootecnista, magíster en Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio y en Clínica y Cirugía de Pequeñas Especies.
Docente de Fisiología Animal en la Universidad Técnica de Machala y candidato doctoral en la Universidad Autónoma de Madrid. Investiga resistencia antimicrobiana bajo el enfoque Una Sola Salud.

FUNDAMENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN BIOQUÍMICA Y FARMACIA: GENÉTICA MOLECULAR, REGULACIÓN GÉNICA Y APLICACIONES DIAGNÓSTICAS

Estimado lector, el libro «Fundamentos de Biología Molecular en Bioquímica y Farmacia» articula el estudio de los procesos celulares a nivel molecular con la práctica profesional en el laboratorio clínico, la bioquímica diagnóstica y la toma de decisiones terapéuticas basadas en evidencia genómica. Concebida como una guía formativa integral y actualizada, la obra responde a las demandas del sector sanitario contemporáneo, donde el análisis e interpretación de datos moleculares resulta indispensable para el diagnóstico temprano y el seguimiento clínico.

A través de una secuencia pedagógica organizada en cinco unidades, el texto examina la estructura del material genético y los procesos celulares básicos, la citogenética humana y los patrones de herencia, los mecanismos de regulación de la expresión génica, y las alteraciones moleculares que originan variabilidad o patología. Finalmente, profundiza en el empleo de técnicas biotecnológicas avanzadas, biomarcadores y métodos de diagnóstico aplicados a la salud.

Con un enfoque didáctico que trasciende la memorización mecánica, cada sección incorpora objetivos formativos, preguntas de análisis, esquemas conceptuales y actividades reflexivas. En su conjunto, la obra enfatiza el rigor metodológico, la calidad analítica y el compromiso ético, consolidándose como un manual de consulta esencial tanto en las aulas universitarias como en los laboratorios de especialidad.

GRUPO BLR

Grupo Editorial BLR
Ecuador
Cel: +593 98 320 4362
https://grupoblr.com/
publicaciones@grupoblr.com

ISBN: 978-9907-852-17-2

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA
1969