

ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME BOVINA VS ENFERMEDAD DE CREUTZFELDT-JAKOB

A más de 7 años de la publicación en Medicina de un editorial¹ en que se comentaba la emergencia de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) como una nueva enfermedad por priones, cabe ya alguna revisión de lo acontecido hasta ahora; por ejemplo, en qué devino su prevista declinación hasta la erradicación; y sobre todo, qué influencia ha tenido la entonces vigente epidemia animal en Gran Bretaña sobre la actual incidencia de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJ) en ese país.

Una vez que en Gran Bretaña se estableciera la causa de la epidemia (contaminación por scrapie de un suplemento dietético para bovinos preparado a partir de carne y huesos de ovejas) y que desde julio de 1988 se prohibiera la utilización de ese compuesto, el número de casos comenzó a declinar a partir de un lapso de 5 años, tiempo aproximadamente equivalente al período de incubación de la enfermedad. Tanto es así que luego del pico epidémico alcanzado en enero de 1993, se inició un sostenido descenso y, a mediados de 1996, la incidencia sólo alcanzaba el cuarto de los máximos niveles anteriormente observados. En base a la extrapolación de la presente curva en descenso, es previsible que la epidemia llegue a su fin alrededor del año 2.000.

De la comparación de esos datos con los de países de menor incidencia (para el caso, Suiza), surge que la epidemia se ha mantenido de hecho confinada a Gran Bretaña, y ello ha ocurrido por una peculiar concatenación de factores de riesgo², incluyendo: a) elevada proporción de ovinos con respecto a bovinos; b) relativamente alta tasa de scrapie endémico; c) consumo por bovinos de suplementos dietéticos elaborados con tejidos ovinos; y d) abandono de la etapa de extracción por solventes orgánicos en el procesamiento de ese alimento, cambio que habría favorecido el mantenimiento de la infectividad del scrapie eventualmente presente.

La posibilidad de que la EEB pudiera transmitirse horizontalmente de bovino a bovino, y verticalmente de vaca a ternero, fue considerada desde el comienzo de la epidemia. Como todos los animales de un mismo rebaño podían haber estado expuestos al mismo riesgo por alimento contaminado, se hacía difícil discriminar entre transmisión horizontal o por ingesta. Sin embargo, la baja proporción de casos por hato de ganado (incidencia acumulativa < 5%), sugirió que la transmisión de animal a animal no estaba ocurriendo; en rigor, no hay evidencias a su favor. En cuanto a la transmisión materna, si es que existe, se daría una tasa muy baja. Se están llevando a cabo estudios para determinar si los pocos casos producidos en animales nacidos luego de la prohibición del suplemento nutritivo, son resultado de transmisión materna, o de riesgo genético, o de diferente grado de exposición al alimento contaminado (accidental consumo por rumiantes de productos dietéticos elaborados para aves y cerdos), o de combinación de todos esos posibles factores³.

Es probable que la emergencia de la epidemia haya resultado de un aumento en la proporción de scrapie presente en el alimento, incremento a su vez posibilitado por la referida omisión de la etapa de extracción por solventes orgánicos en su manufacturación. Sin embargo, es sorprendente que la infección experimental por scrapie en bovinos no reproduzca el cuadro clínico ni neuropatológico de la EEB espontánea. Quizás la comprobada existencia de más de 20 diferentes cepas de scrapie, así tipificadas de acuerdo a los períodos de incubación, y la distribución de los cambios neuropatológicos luego de inoculadas al ratón, pueda explicar las limitaciones de los estudios emprendidos. De ahí que Collee y Bradley³, se pregunten: cuál de las cepas de scrapie hubiera debido utilizarse para inocular experimentalmente a los bovinos? ¿Cuál es el genotipo de bovinos que debería haberse seleccionado para su inoculación? ¿Por cuánto tiempo hubiera correspondido mantener el período de observación? Es comprensible que una investigación de ese alcance deba postergarse en relación a otros estudios con objetivos más prioritarios. En toda forma, si el agente de la EEB derivó inicialmente del scrapie, la continuada presión selectiva impuesta por el pasaje a otra especie habría determinado la aparición de una cepa adaptada al bovino, ya que la cepa bovina se diferencia

del scrapie en su estabilidad (todos los aislamientos logrados en Gran Bretaña y en Suiza se comportan igual cuando son inoculados al ratón), en su más breve período de incubación, y en el predomino de lesiones histológicas en cerebro posterior.

Aún cuando reste precisar los mecanismos involucrados, el hecho a tener en cuenta es que un prion fue capaz de cruzar la barrera de las especies. Y que así como del ovino pasó al bovino, del bovino pasó al gato, ya que el responsable de la nueva enfermedad felina⁴ exhibe el mismo fenotipo que el agente de la EEB. Asumiendo que los gatos habían estado igualmente expuestos al scrapie y a la EEB pero sólo fueron susceptibles a la última, eso indica que EEB exhibe mayor capacidad de circulación que el scrapie. Para evaluar la posibilidad de que la EEB transmitida al hombre se exteriorizara por CJ, desde 1990 se re-instituyó en Gran Bretaña un monitoreo de la incidencia de la enfermedad humana. A partir de entonces, era previsible que habría que esperar años para disponer de información válida, es decir posterior a un aproximado tiempo de incubación, ya que de existir algún riesgo por exposición a EEB, sobre todo si se hubiera dado desde 1984 (emergencia de los probables primeros casos de enfermedad bovina) hasta 1989 (vigencia plena de la prohibición del alimento cuestionado). Del informe elaborado por el proyecto de vigilancia en la Comunidad Europea (BIOMED 1) que estudió la incidencia del CJ en trabajadores en contacto con ganado en Francia, Alemania, Italia y Holanda, no surgió que los factores de riesgo fueran mayores para los británicos, incluyendo a veterinarios, matarifes y carniceros⁵. Pero sí resultó preocupante cuando en 1995 se observó una enfermedad tipo CJ esporádico en dos adolescentes británicos^{6,7}; más aún, hasta febrero de 1997, la Unidad de Vigilancia de CJ en Edinburgo había admitido el registro de un total de 10 casos en menores de 42 años, con un perfil neuropatológico hasta entonces inédito⁸: comienzo a temprana edad, alteraciones de conducta precediendo a la instalación de demencia, ataxia, cambios neuropatológicos tanto comunes al CJ (espongiosis, pérdida neuronal y astrocitosis) como excepcionales (placas por depósito de la isoforma patológica de la proteína prion), y ausencia de los signos electroencefalográficos propios del CJ.

Fue en base a esa descripción que desde marzo de 1996 circuló entre todos los neurólogos de Gran Bretaña, que se les solicitó la denuncia de aquellos casos que pudieran ser atribuidos a la denominada nueva variante de la enfermedad (nvCJ), para listarlos en forma separada. A febrero de 1997, se habían registrado 37 casos sospechosos en menores de 50 años; entre las 11 muertes ocurridas, se efectuaron 9 necropsias con los siguientes resultados: confirmación de un caso de nvCJ, diagnóstico de un caso de CJ clásico, y diagnósticos de otras etiologías en 3, quedando por completar exámenes en las 4 autopsias restantes. Por otra parte, la biopsia cerebral posibilitó el diagnóstico de nvCJ en un paciente que luego murió sin autopsia, y en otros 2 que seguían vivos⁹.

Es indudable que se ha establecido la existencia de una nvCJ en menores de 45 años, con hasta ahora 15 casos en Gran Bretaña y uno en Francia¹⁰. Si bien hay suficientes evidencias para caracterizarla como forma no hereditaria de la enfermedad¹¹, también es cierto que no se dispone de pruebas directas que la vinculen a la EEB. Si es que llega a comprobarse alguna relación entre la enfermedad bovina y la humana, será en base a estudios de transmisión experimental en animales y a una continuada vigilancia epidemiológica. Es probable que el tamizaje de pacientes seleccionados para un análisis del gen de proteína prion (PrP) llegue a revelar que el CJ está subdiagnosticado por los corrientes abordajes clínicos e histopatológicos¹¹. Se hace por tanto imprescindible poder disponer de un diagnóstico premortem menos invasivo que la biopsia cerebral; al respecto, parece alentadora la perspectiva brindada por pruebas sobre líquido cefalorraquídeo y tejido amigdalino¹².

En estudios de transmisión de la infección, el ratón transgénico que expresa PrP humana en adición a la PrP murina, luego de inoculado con EEB sólo produjo priones murinos, indicando que la barrera entre especies se había mantenido firme a más de 300 días de observación¹³. Si la base de esa barrera estuviera dada por la diferencia entre la secuencia de aminoácidos de PrP entre el donante y el receptor, es de destacar que las PrP ovina y bovina difieren en 7 posiciones, en tanto que las PrP bovina y humana lo hacen en más de 20. Sin embargo, en la secuencia del gen PrP, han sido identificadas dos pares de sustituciones de aminoácidos sólo compartidas por los bovinos y los grandes monos incluyendo al hombre¹⁴. Es tema en controversia que ello pueda estar relacionado con las relativas resistencia o susceptibilidad del ser humano a la enfermedad bovina, y que sugiera que, para el hombre, la cepa adaptada al bovino sea potencialmente más peligrosa que el scrapie¹⁰. Pero ¿cómo podría transmitirse la enfermedad bovina al hombre? Se han planteado tres posibilidades: inadvertidamente, por injertos o inyecciones de productos bovinos (catgut y preparados farma-

céuticos); riesgo laboral en manipuladores de carne o huesos bovinos; e ingestión alimentaria de aquellos productos bovinos de eventual infectividad (cerebro, retina y médula espinal). Las medidas preventivas consiguientemente adoptadas en Gran Bretaña por una legislación periódicamente ampliada³, fueron la prohibición de suplementos dietéticos para rumiantes que hubieran sido elaborados con proteínas derivadas de rumiantes, el sacrificio y eliminación de carcasas de los animales sospechosos con compensación al propietario del 50% primero y del 100% después, y la prohibición del empleo de determinados materiales bovinos (cerebro, intestino, timo, cráneo, carne recuperada de vértebras) en alimentos para humanos y animales. Como resultado del tipo de legislación implementada, entre los cinco países en que se ha demostrado EEB en ganado nativo, Gran Bretaña exhibe una declinación significativa, y en Suiza es probablemente inminente; en cambio, en Francia, Portugal e Irlanda, la incidencia está en aumento, aunque el número de casos sea bajo¹⁰.

Ya a una década de la emergencia de la EEB, se han reunido los expertos de la OMS para efectuar una revisión de las más recientes investigaciones en encefalopatías espongiformes transmisibles, y sobre esa base alertar acerca del posible riesgo de productos medicinales de origen humano y animal, particularmente en referencia a componentes de la sangre¹⁵. Durante esa reunión, que tuvo lugar del 24 al 26 de marzo del presente año, fue Paul Brown (*National Institute for Neurological Disease and Stroke, Bethesda, MD, USA*), quien presentó datos sugerentes de presencia de infectividad por CJ en sangre tanto entera como fraccionada; según resultados hasta entonces no publicados, ciertas fracciones de plasma provenientes de ratones adaptados a la infección por CJ, pueden transmitir la enfermedad cuando son inoculadas intracerebralmente a ratones sanos. Si bien Brown advirtió acerca de la inconveniencia de la extrapolación a la clínica humana, ya que no existen evidencias de que la infección pueda ser transmitida por vía endovenosa, la OMS decidió recomendar que los criterios de selección para donar sangre excluyan a las personas con riesgo de CJ y de toda otra encefalopatía espongiforme transmisible, es decir aquellos con antecedentes familiares de esas enfermedades o que alguna vez hayan recibido extractos de hipófisis humana (hormona de crecimiento y gonadotrofina) o hayan sido receptores de injertos de duramadre humana. Todos los participantes a la reunión coincidieron en la necesidad de profundizar las investigaciones en curso; a ese respecto, Brown está planeando experimentos para evaluar si los métodos simples pero capaces de remover los contaminantes del plasma, también pueden abolir la infectividad por CJ; en cuanto a los Consejos Británicos de Investigación tanto de Biotecnología y Ciencias Biológicas como Médicas, han acordado la suma de 8 millones de libras para asegurar la continuidad de los estudios sobre encefalopatías espongiformes transmisibles.

Es probable que en los próximos 1 a 3 años pueda saberse si la nvCJ ha quedado limitada a unos pocos casos o si, por el contrario, se ha expandido. Es evidente que la enfermedad bovina está bajo control, aun cuando no cabe descartar la posibilidad de su emergencia en los ganados ovino y caprino¹⁰. Dadas las características peculiares de los priones, quizás haya que esperar una o dos décadas más de vigilancia epidemiológica de la EEB y del CJ para acceder a una información suficiente como para afirmar o negar la existencia de un vínculo entre la enfermedad bovina y la humana.

María I. Berría

Departamento de Microbiología,
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

1. Berría MI. Acerca de los llamados priones. *Medicina (Buenos Aires)* 1990; 50: 563-5.
2. Nathanson N, Wilesmith J, Griot C. Bovine spongiform encephalopathy (BSE): causes and consequences of a common source epidemic. *Am J Epidemiol* 1997; 145: 959-69.
3. Collee JG, Bradley R. BSE: a decade on part I. *Lancet* 1997; 349: 636-41.
4. Bruce M, Chree A, McConnell I, Foster J, Pearson G, Fraser H. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice strain variation and the species barrier. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London series B-Biological Sciences* 1994; 343: 405-11.
5. Delasnerie-Laupetret N, Poser S, Pocchiari M, Weintjens DPWM, Will RG. Creutzfeldt-Jakob disease in Europe. *Lancet* 1995; 346: 898.

6. Britton TC, Al-Sarraj S, Shaw C, Campbell T, Collinge J. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a 16-year-old in the UK. *Lancet* 1995; 346: 1155.
7. Bateman D, Hilton D, Love S, Zeidler M, Beck J, Collinge J. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a 18-year-old in the UK. *Lancet* 1995; 346: 1155-6.
8. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996; 347: 921-5.
9. Will RG, Knight RSG, Zeidler M, Steward G, Ironside JW, Cousens SN, et al. Reporting of suspect new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1997; 349: 847.
10. Collee JG, Bradley R. BSE: a decade on part 2. *Lancet* 1997; 349: 715-21.
11. Collinge J, Sidle KCL, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of "new variant". *Nature* 1996; 383: 685-90.
12. Will R, Zeidler M. Diagnosing Creutzfeldt-Jakob disease. *BMJ* 1996; 313: 833-4.
13. Collinge J, Palmer MS, Sidle KCL, Hill AF, Gowland I, Meads J, et al. Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein. *Nature* 1995; 378: 779-83.
14. Krakauer DC, Pagei M, Southwood TRE, Zannotto PMdeA. Phylogenesis of prion protein. *Nature* 1996; 380: 675.
15. Morris K. WHO reconsiders risks from Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1997; 349: 1001.

- - -

El ambiente adecuado (para hacer investigación) es un sitio de trabajo intenso y estimulante, en el que la investigación original es apreciada y ayudada. La dirección y, sobre todo, el ejemplo de investigadores auténticos, respetados por su amor a la ciencia, su capacidad y sus cualidades morales son el mejor estímulo para dedicarse a la Ciencia.

Bernardo A. Houssay (1887 - 1971)

El Papel de la Ciencia. *Anales de la Sociedad Científica Argentina* 1950; CL: 197.

MAPEO DE GENES EN EL RATÓN

El ratón es considerado por muchos investigadores como un modelo animal casi perfecto porque, además de su corto tiempo generacional, fácil mantenimiento y alta *performance* reproductiva, tiene varias características que, cuando se las considera en conjunto, lo hacen un modelo único para la genética experimental. De estas, hay tres que vale la pena hacer resaltar:

1. Es posible obtener cepas que son virtualmente homocigotas para todos sus loci por medio de la cruce repetida entre hermanos (endocria). Muchas de esas cepas han sido establecidas en las últimas décadas y presentan la ventaja, para los mapeos de genes, de producir un solo tipo de gametas. Estas cepas, denominadas consanguíneas (*inbred strains*, en inglés), están constituidas por animales genéticamente idénticos y con estabilidad genética a largo plazo, lo que asegura la repetibilidad de los experimentos¹.

2. El ratón es inusual en el sentido de que es posible criar híbridos viables y fértiles acoplando las cepas de laboratorio antes mencionadas (derivadas de las especies *Mus musculus domesticus* o *Mus musculus musculus*) con varias especies murinas derivadas de animales salvajes (por ejemplo *Mus spretus*). Cruzamientos de este tipo han sido muy utilizados para establecer mapas de ligamiento porque permiten la segregación de un gran número de polimorfismos genéticos en una sola cruce².

3. El extenso conocimiento de los estadios tempranos de la embriogénesis del ratón ha permitido el desarrollo de técnicas que producen alteraciones heredables del genoma casi "a pedido". En el ratón es relativamente fácil producir en forma eficiente animales transgénicos inyectando secuencias de ADN dentro del pronúcleo de un huevo fertilizado. Es posible incluso substituir, en la línea germinal, la copia normal de un gen dado por una "mutante", vía la técnica de recombinación homóloga en células primordiales embrionarias (*ES cells*). La transgénesis y la recombinación homóloga han reforzado el papel fundamental del ratón como modelo en biomedicina porque se trata del único mamífero en el cual se puede evaluar en forma experimental el rol biológico de secuencias de ADN de función desconocida. El ratón ha sido utilizado por los genetistas desde los primeros experimentos realizados por Cuénot, quien en 1902 informó que las leyes de Mendel podían ser aplicadas también a esta especie. Desde entonces, cientos de mutaciones han sido descritas y localizadas en algún cromosoma murino en particular, lo que llevó al rápido desarrollo de mapas genéticos de cierto nivel de densidad. Ya para 1980 el ratón tenía el mapa genético más completo y extenso de todos los mamíferos, incluido el hombre. Con la llegada de las técnicas de biología molecular, en especial el ADN recombinante, el ratón perdió este liderazgo en manos de la genética humana, pero al mismo tiempo quedó en claro la enorme complementación entre estas dos especies desde muchos puntos de vista, en particular, los mapeos de genes³.

El genoma murino y su mapa genético

El ratón de laboratorio "estandar" tiene un cariotipo de 40 cromosomas (19 autosómicos más el par sexual). Los cromosomas murinos son difíciles de diferenciar en los preparados citogenéticos porque, contrariamente a los humanos, son todos acrocéntricos y muestran una graduación continua en el tamaño. El contenido de ADN del genoma haploide del ratón es de 3 picogramos (3×10^{-12} g) que sería un equivalente a $2,7 \times 10^9$ pares de bases (pb). Según los cálculos actuales, no más del 5-8% del contenido de ADN es "funcional" mientras que el resto está representado por secuencias de baja complejidad y una gran variedad de secuencias repetitivas de distintos tamaños. Algunas de éstas, particularmente las cortas, han sido muy útiles para la construcción de mapas genéticos. Según las estimaciones más recientes, el genoma murino contendría entre 50.000 y 100.000 genes, de los cuales sólo un pequeño porcentaje ha sido identificado, fundamentalmente por la existencia de mutaciones o por trabajos de genética molecular.

La forma más racional de desarrollar un mapa genético del genoma del ratón es hacerlo en forma gradual, paso a paso, primero ubicando una serie de loci de referencia (*anchor loci*), o de marcadores, e ir aumentando progresivamente el número de los mismos en los espacios desiertos hasta lograr un "andamio" sólido. Con este enfoque escalonado y, teniendo en cuenta que el número de marcadores a disposición es suficientemente grande, es posible hoy en día realizar mapas de alta densidad en el ratón. De hecho, ésta es la estrategia que vienen utilizando los genetistas desde comienzos del siglo veinte, cuando J.B. Haldane y colaboradores informaron en *Journal of Genetics* que las mutaciones del color del pelaje, albino (*c*) y *pink-eyed dilution* (*p*), estaban ligadas⁴.

Hay tres clases de mapas que interesan a los genetistas:

1. Mapas de ligamiento. El establecimiento de mapas de ligamiento (*linkage maps*) se basa en el hecho de que, durante la meiosis, los loci que se encuentran en diferentes cromosomas se separan al azar en las gametas mientras que los que se encuentran en un mismo cromosoma tienden a cosegregar, a menos que un evento de recombinación (*cross-over*) rompa esa asociación "parental". La probabilidad de que dos genes sean separados por un evento de recombinación dependerá de la distancia que hay entre ellos. Esto se ve reflejado en la elección de la unidad de mapeo, el centiMorgan (cM), que corresponde al 1% de probabilidad de producir una gameta recombinante luego de una meiosis. Un mapa de ligamiento es, en otras palabras, un diagrama de los arreglos lineales de los genes localizados en un cromosoma dado. La densidad de un mapa genético estará correlacionada con el número de polimorfismos que segregan en una cruce particular mientras que su resolución depende del número de gametas (= número total de meiosis) analizados en la progenie. La longitud total del mapa de ligamiento del ratón ha sido estimada por diversos investigadores, usando diferentes enfoques, en el orden de los 1550 a 1600 cM. Esto quiere decir que, en promedio, 1 cM en el genoma del ratón corresponde a 1700 kilobases (kb), mientras que en el humano (en el cual la frecuencia de recombinación es mucho mayor) esta cifra es equivalente a 1000 kb⁴.

2. Mapas cromosómicos. Mientras que los mapas de ligamiento requieren la realización de protocolos con cruces de animales, los mapas cromosómicos se logran usando técnicas que no incluyen la reproducción sexual como son la *hibridación in situ* (poco utilizada en ratones porque es más fácil y práctico realizar esquemas reproductivos), los *híbridos de células somáticas* (muy usados para localizar genes humanos) y los *mapas de delección* (es uno de los métodos más interesantes para desarrollar rápidamente un mapa preciso de una pequeña región cromosómica).

3. Mapas físicos. Un mapa físico (*physical map*) es la representación real del alineamiento de los genes en un cromosoma. El orden de los genes es el mismo que el dado por los mapas de ligamiento, pero las distancias son medidas en kb o megabases (Mb). Estos mapas constituyen un paso crucial en la caracterización estructural y funcional del genoma. Pueden lograrse por diversos métodos pero el más conveniente es el ordenamiento de sets de clones superpuestos (*contigs*), ya sean éstos clonados en fagos (P1 en general), cósmidos, cromosomas artificiales de bacterias (BACs) o cromosomas artificiales de levaduras (YACs). Siguiendo esta estrategia, la realización de un mapa físico es un "segundo paso" una vez establecido el mapa de ligamiento³.

Integración de mapas (mapas consenso)

Para una cruce de animales determinada, se puede establecer un mapa de ligamiento exclusivamente para los marcadores que segregan en la misma pero, lamentablemente, el número de esos marcadores es muchas veces limitado. Esta limitante se extiende también al polimorfismo entre las cepas parentales (o las técnicas utilizadas para detectarlo). En este sentido, la utilización de secuencias de ADN conocidas como *microsatélites* o *SSLP* (*simple sequence length polymorphism*) como marcadores moleculares facilitó enormemente los trabajos de mapeo debido a la posibilidad de amplificación de estos pequeños segmentos por medio de la técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) y a su disponibilidad (hay más de 6000 descriptos, lo que asegura un marcador cada 450 kb). Aproximadamente, el 50% de los microsatélites descriptos hasta el momento en el ratón muestra polimorfismo entre las distintas cepas de laboratorio, aunque ese porcentaje se eleva al 77% entre la cepa C57B1/6 y *M.m. castaneus*, y al 90% si se trata de *M. spretus*⁵. Aunque se han usado ocasionalmente técnicas no sexuales en mapeos genéticos del ratón, la mayoría de la información ha provenido, sin ninguna duda, del uso de cruces informativas de ratones como las *retrocruzas*

(*backcross*), las *intercruzas* (*intercross*) y las *retrocruzas interespecíficas*. La utilización de especímenes salvajes del mismo género *Mus* (pero de otras especies) para cruzar con las cepas de laboratorio clásicas y obtener parentales más polimórficos dió resultados exitosos y llevó los mapeos murinos a una nueva era. La primera especie salvaje utilizada con este propósito fue *Mus spretus* originaria del mediterráneo.

Es muy importante combinar los resultados obtenidos en distintas cruzas independientes en un "mapa consenso" (cuando los datos obtenidos poseen marcadores en común). Para ayudar a la integración de los diversos mapas genéticos, los genetistas han definido un set de loci de referencia (marcadores universales con homólogos en varias especies) que se encuentran uniformemente distribuidos en todos los cromosomas y son, a la vez, muy polimórficos⁶. Los mapas consenso actualizados para el genoma del ratón son publicados periódicamente en las revistas *Mammalian Genome* y *Mouse Genome*, y pueden obtenerse a través de la red Internet (<http://www.jax.org>) en la base de datos *Mouse Genome Database* (MGD) del *Jackson Laboratory*.

Son varios los programas de mapeo a gran escala que se han venido desarrollando en los últimos 10 años en el genoma del ratón. Históricamente, los dos más importantes son los llevados a cabo en el *Instituto Pasteur, París* y en el *Frederick Cancer Research and Development Center, Maryland, USA*, sumándose en la actualidad los programas del *Jackson Laboratory, Maine, USA*, el *Mouse Genome Project* del *National Center for Human Genome Research, NIH/DOE, Maryland, USA* y el programa en colaboración entre el *MRC británico* y el *Instituto Pasteur (European Collaborative Interspecific Backcross o EUCIB)*. El panel de retrocruzas del EUCIB es en la actualidad el más grande del mundo con un número de 982 muestras de ADN evaluadas para loci de referencia a lo largo del genoma⁷.

Aplicaciones de los mapas genéticos del ratón

Estudios de evolución del genoma

La distribución de los genes responde a cambios producidos durante la evolución del genoma en diferentes momentos de la historia de la especie. Estos mecanismos aún no son bien conocidos pero, con el desarrollo de buenos mapas genéticos, se podrá comprender mejor lo ocurrido durante la evolución de estas secuencias (por ejemplo, la duplicación de un gen ancestral que codifica para la amilasa en el cromosoma 3 del ratón dió como resultado dos copias del gen, *Amy1* y *Amy2*, siendo el primer gen activo en las glándulas salivales y el segundo en el páncreas).

Establecimiento de homologías cromosómicas entre especies

De los 3.000 genes mapeados actualmente en el ratón, hay alrededor de 1.800 genes homólogos con genes humanos y se observó que existen grupos de genes que muestran el mismo orden lineal en ambas especies (grupos sinténicos)⁸. Cada uno de estos grupos constituye un segmento cromosómico conservado resultando en homologías inter-específicas. Actualmente hay 185 segmentos de este tipo reconocidos en el genoma murino, con tamaños que van desde 1 cM a más de 50 cM. La longitud total de todos estos segmentos conservados es aproximadamente 1.050 cM, lo que correspondería al 65% del genoma del ratón. Estos mapas comparativos pueden usarse para predecir ligamientos entre genes y para identificar "genes candidato" para enfermedades genéticas en ambas especies. La identificación del gen *obese* responsable de fenómenos de obesidad en el ratón y el hombre es un ejemplo reciente de este tipo de trabajos⁹. Asimismo, estas homologías aportarán datos para el ambicioso proyecto de la secuenciación completa del genoma humano (*Human Genome Project*) lanzado en 1988. En la actualidad, se encuentran terminadas las secuencias genómicas completas correspondientes a 141 virus, 51 organelas, 2 eubacterias (*Haemophilus influenzae* y *Mycoplasma genitalium*), 1 arcobacteria (*Methanococcus jannaschii*) y 1 eucariota (la levadura *Saccharomyces cerevisiae*) siendo este último, con 12 Mb, el genoma más grande secuenciado hasta el momento¹⁰. Un mapa de este tipo para el genoma humano estará disponible recién en el año 2005, siempre que se cumpla con lo proyectado. En vistas al tremendo valor que tendría un mapa de estas características para la biomedicina, no es razonable esperar hasta ese momento para comenzar a diseñar dicho mapa. Es por eso que se está trabajando actualmente en construir mapas en base

a fragmentos cortos de ADNc, amplificados por PCR a partir de extremos no-traducidos de ARNm, denominados EST's (*expressed sequence tags*). La colección pública de ESTs es actualmente de 450.000 secuencias, entre las cuales se encuentran representados el 80% de los genes humanos. Asimismo, se está trabajando en la localización de EST's humanos, utilizando los mismos *primers*, en el genoma de la rata y el ratón, lo que permitirá descubrir nuevas homologías. Finalmente, el último mapa génico humano (publicado en el año 1996 por el consorcio internacional a cargo del proyecto)¹¹ contiene 16.000 loci mapeados, representados por secuencias de ADNc.

Fernando Benavides¹, Jean-Louis Guénet²

¹ Instituto de Investigaciones Hematológicas,
Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires;

² Unité de Génétique des Mammifères,
Institut Pasteur, France

1. Doolittle D, Davisson M, Guidi J, Green M. Catalog of mutant genes and polymorphic loci. *Inc: Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*. M.F. Lyon, S. Rastan, S. Brown (eds), Oxford: Oxford University Press, 1996.
2. Guénet J-L, Simon D, Avner P. The use of interspecific mouse crosses for gene localization: present status and future perspectives. *Curr Top Microbiol Immunol* 1988; 137: 13-7.
3. Silver L (ed). *Mouse Genetics. Concepts and applications*. Oxford: Oxford University Press, 1995.
4. Guénet J-L. The Mouse Genome. In: *Genomes, Molecular Biology and Drug Discovery*, New York: Academic Press, 1996; 27-51.
5. Love J, Knight A, Mc Aleer M, Todd J. Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analyzed microsatellites. *Nucleic Acid Res* 1990; 18: 4123-30.
6. Lyon M, Cocking Y., Gao X. Mouse chromosome atlas. *Mouse Genome* 1996; 94: 29-73.
7. Breen M, Deakin L, MacDonald B, et al. Towards high resolution maps of the mouse and human genomes-A facility for ordering markers to 0.1 cM resolution. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 621-7.
8. Nadeau J, Davisson M, Doolittle D, et al. Comparative map for mice and humans. *Mammalian Genome* 1992; 3: 480-536.
9. Zhang Y, Proença R, Maffei M, Barone M, Friedman J. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-32.
10. Goffeau A, Barrell B, Bussey H, et al. Life with 6.000 genes. *Science* 1996; 274: 546-67.
11. Schuler G, Boguski M, Stewart E, et al, A gene map of the human genome. *Science* 1996; 274: 540-5.

- - -

If we do not plant the tree of knowledge when young, it will give us no shade when we are old.

Si no plantamos el árbol de la sabiduría cuando jóvenes, no podrá prestarnos su sombra en la vejez.

Lord Chesterfield (1694 - 1773)

Letters to his son, 1747

COMO UN DESCUBRIMIENTO POR SERENDIPISMO EN EL RATON LLEVO A UN ENSAYO TERAPEUTICO CON GONADOTROFINA CORIONICA EN PACIENTES CON SARCOMA DE KAPOSÍ

En investigación, los descubrimientos inesperados son los que más satisfacción me han proporcionado - los que se han dado en llamar descubrimientos por serendipismo¹. Tal fue el caso de un experimento llevado a cabo en el laboratorio de Robert Gallo que además viene al caso del *Coloquio en Medicina* sobre el Sarcoma de Kaposi publicado en el número anterior de *Medicina*². En aquel laboratorio, -hoy en el flamante *Institute of Human Virology (IHV), University of Maryland, Baltimore* - habían establecido una línea celular, KSY-1, a partir del exudado pleural de un paciente HIV+ con sarcoma de Kaposi; estas células inducen un sarcoma en ratones inmunodeficientes (*nude mice*) con todas las características del sarcoma de Kaposi humano. Al inocular un número importante de ratones machos en los cuales el tumor se desarrolló a las 3 a 4 semanas, observaron que en algunas hembras que se habían deslizado por equivocación, y que naturalmente estaban preñadas, el tumor no aparecía. Al repetir el experimento, se demostró que el tumor prendía en las hembras pero no en las preñadas, es decir, durante las primeras etapas de la preñez. Este resultado inesperado los llevó a probar el efecto de la gonadotrofina coriónica humana (hCG) sobre el desarrollo del tumor: los animales, aun los machos, tratados con esa hormona no desarrollaban tumor^{3, 4}.

Con el entusiasmo que lo caracteriza, Gallo pronto inició la aplicación terapéutica de este hallazgo en enfermos HIV+ con sarcoma de Kaposi. Reunió 36 pacientes de 4 centros diferentes (dos en EE. UU., uno en Francia y otro en Bélgica). En un ensayo de Fase 1 y 2, un total de 24 pacientes recibieron inyecciones intralesionales de hCG 3 veces a la semana durante 2 semanas en dosis de 250, 500, 1000 o 2000 UI (6 pacientes por dosis). En un ensayo doble-ciego, 12 pacientes adicionales recibieron 2000 UI o el vehículo sólo (6 c/u) en 2 lesiones. Sin entrar en los detalles que se pueden apreciar en la publicación de estos ensayos⁴, los autores concluyeron que la inyección intralesional de hCG induce una importante regresión del sarcoma de Kaposi, resultado que era dosis-dependiente: la hormona induciría apoptosis de los tumores. Como era de esperar este trabajo fue ampliamente criticado aun en el *Editorial*⁵ acompañante del trabajo en *New England Journal of Medicine*.

Cinco meses más tarde la misma revista publicó una *Carta al Editor* de Pamela Harris⁶ quien insiste en el tratamiento sistémico con hCG: describe el tratamiento de 6 enfermos portadores de lesiones muy avanzadas de sarcoma de Kaposi con hCG intramuscular en dosis de 150000 a 700000 UI tres veces por semana con muy buenos resultados: esta terapia fue muy bien tolerada y llevó a la remisión de todas las lesiones^{6, 7}. La respuesta de Gallo y col.⁸ a esta carta añade una nota interesante: parecería que sólo ciertas preparaciones comerciales de hCG tienen efecto anti-sarcoma de Kaposi y que la hormona recombinante prácticamente no tiene efecto. Indudablemente queda mucho por investigar antes de llegar a una aplicación generalizada de esta terapia.

En cuanto a la etiología del sarcoma de Kaposi, se plantea un problema similar. Para algunos sería la consecuencia de una infección sistémica con un virus Herpes, denominado HHV-8 o KSHV (*Kaposi sarcoma herpes virus*)⁹ y para otros, incluyendo a Gallo, no se ha confirmado todavía la relación causa-efecto⁸.

En cuanto a la incidencia del sarcoma de Kaposi en SIDA en nuestro país vale la pena citar el trabajo de Rodríguez y cols¹⁰ del Hospital Fernández quienes reunieron 161 casos en 13 años: discuten diferentes esquemas de tratamiento, según el grupo de riesgo considerado, con algunos resultados alentadores.

Christiane Dosne Pasqualini

Instituto de Investigaciones Hematológicas,
Academia Nacional de Medicina,
Av. Las Heras 3092, 1425 Buenos Aires

1. Pasqualini RQ. Houssay y el serendipismo. *Medicina (Buenos Aires)* 1981; 41: 827-8.
2. *Coloquio en Medicina*. Sarcoma de Kaposi en trasplantados renales. *Medicina (Buenos Aires)* 1997; 57: 367-72.
3. Richman E. The once and future king. *The Sciences* 1996; 36: 12-5.
4. Gill PS, Lunardi-Iskandar Y, Louie S, et al. The effects of preparations of human chorionic gonadotropin on AIDS-related Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* 1996; 335: 1261-9.
5. Krown SE. Kaposi's sarcoma - what's human chorionic gonadotropin got to do with it? *N Engl J Med* 1996; 335: 1309-10.
6. Harris PJ. Intralesional human chorionic gonadotropin for Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* 1997; 336: 1187.
7. Harris PJ. Treatment of Kaposi's sarcoma and other manifestations of AIDS with human chorionic gonadotropin. *Lancet* 1995; 346: 118-9.
8. Gill PS, Lunardi-Iskandar Y, Gallo RC. Intralesional human chorionic gonadotropin for Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* 1997; 336: 1188.
9. Moore PS, Chang Y. Detection of herpes virus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and without HIV infection. *N Engl J Med* 1995; 332: 1181-5.
10. Rodríguez E, Pérez H, Bourren P, et al. Sarcoma de Kaposi. Seguimiento de 161 enfermos durante 13 años. Elementos de pronóstico y enfoques terapéuticos. *Dermatol Argent* 1997; 3: 124-32.

- - - -

On peut même dire qu'en recherche fondamentale, s'il n'y a pas au départ une bonne dose d'incertitude sur les résultats d'une expérience, il n'y a guère de chance qu'il s'agisse d'une question importante... Le résultat d'une expérience qui tourne comme prévu est parfois intéressant. Mais il présente en général beaucoup plus de valeur si c'est une surprise. En fait on peut mesurer l'importance d'un travail scientifique à l'intensité de la surprise qu'il provoque.

En investigación básica, si no hay de entrada una buena dosis de incertidumbre en cuanto a los resultados del experimento, se puede incluso decir que no hay mucha chance de que se trate de una cuestión importante... El resultado de un experimento que da lo previsto es a veces interesante. Sin embargo tiene mucho más valor si es una sorpresa. De hecho se puede medir la importancia de un trabajo científico con la intensidad de la sorpresa que provoca.

François Jacob

La souris, la mouche et l'homme. Paris: Editions Odile Jacob, 1997, p 26