

XXXV CONGRESO ANUAL DE LA FUNDACIÓN/ASOCIACIÓN ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DEL HÍGADO

Introducción a la genética clínica

J. Crespo

Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España

Introducción

La genética moderna se inicia con los estudios de Mendel, cuyas leyes genéticas son aún hoy en día la base del conocimiento teórico de la transmisión hereditaria. En 1902, Walter Sutton correlacionó la asociación de los cromosomas maternos y paternos en pares, y su posterior separación durante la división celular, con las leyes mendelianas de la herencia. No fue hasta 1934 en que se empieza a vislumbrar el papel del ADN como portador de la información genética. Más tarde, Watson y Crick dedujeron que el ADN estaba formado por una doble hélice regular constituida por desoxirribosa y fosfatos con las bases nucleotídicas en forma de peldaños, formando enlaces A-T y C-G¹. Con la introducción de la biología molecular a partir de la década de los ochenta y, fundamentalmente, con la secuenciación del genoma humano en los primeros años del siglo XXI, se puede decir que estamos ante una nueva concepción de la genética: la genómica^{2,3}. Esta área del conocimiento no sólo pretende la descripción de los genes, sino que pretende un análisis de conjunto que incluye la estructura y función de los genes, su regulación pre y post-transcripcional, las proteínas que producen, los metabolitos que aparecen como consecuencia de la función proteica y, en fin, los circuitos íntimos que regulan el funcionamiento de las células de forma individual y colectiva. En este sentido, la genómica y las tecnologías derivadas de ésta, como la proteómica y la transcriptómica, entre otras, han supuesto un cambio no sólo cuantitativo sino cualitativo en la aproximación al conocimiento básico de las cuestiones biológicas.

Conceptos básicos de genética molecular

Estructura básica del ADN (fig. 1)

El ADN es un polinucleótido que contiene la información genética. Hay 4 nucleótidos diferentes: adenina (A), timina

Correo electrónico: javiercrespo@teleline.es

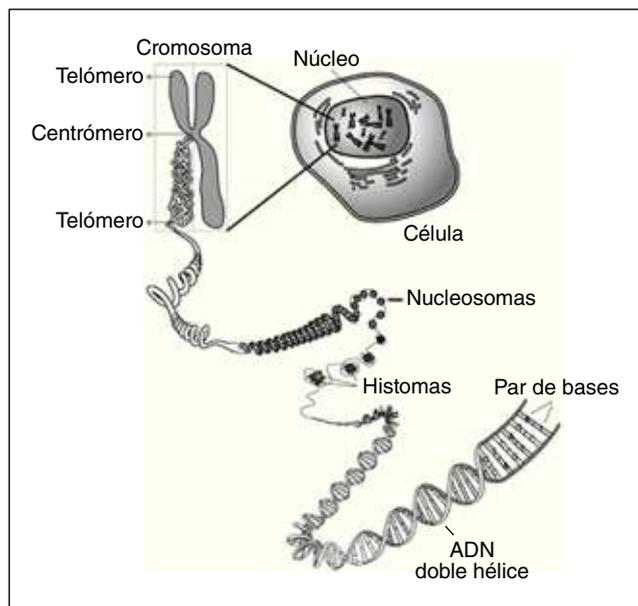


Figura 1 Estructura básica del ADN.

(T), guanina (G) y citosina (C). El orden en que se sitúan estos nucleótidos es la secuencia del ADN. Ésta sería la estructura básica del ADN; sin embargo, la mayor parte de las veces el ADN se encuentra formando una estructura más compleja, que consiste en 2 cadenas como la anterior que se enlazan una con otra de manera complementaria y siempre se mantiene la siguiente regla: la base A se une con T, y C con G. Estas 2 cadenas se enrollan una sobre otra, formando la doble hélice.

Definición de gen (fig. 2)

Se puede definir un gen como la unidad básica de la herencia, que consiste en un segmento de ADN que codifica

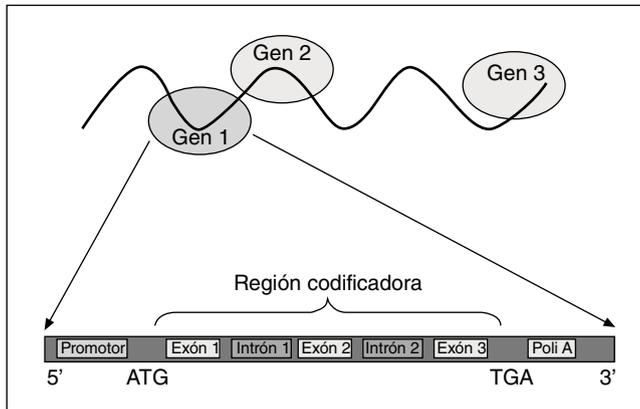


Figura 2 Estructura de un gen eucariota.

una proteína específica o un segmento de una proteína (o una molécula de ARN) con una característica o función determinada. Aunque esta definición es útil desde un punto de vista conceptual, no es totalmente cierta, ya que hoy se sabe que determinados genes son capaces de codificar más de un polipéptido y, por otra parte, un mismo polipéptido puede ser codificado por diferentes genes. El gen es la parte más importante del genoma, porque es la región que define las características estructurales y funcionales de nuestro organismo. Sin embargo, debemos señalar que las regiones génicas representan sólo el 3% del genoma, mientras que el 97% restante de las secuencias de nucleótidos presentes en el ADN no tiene una función claramente codificante y desempeña funciones reguladoras, estructurales y, en gran medida, su función es desconocida. Básicamente, un gen está constituido por:

- Promotor. Es una región del ADN que no codifica ningún aminoácido, pero que determina el punto en el que la ARN polimerasa comienza a transcribir un gen.
- Región codificadora. Es la parte del gen que contiene la información para la síntesis de proteínas. En esta región se diferencian los exones (secuencia codificante de ADN) de los intrones (secuencia no codificante de ADN que se transcribe a ARN mensajero [ARNm] en su estado inmaduro, pero que es escindida de éste al transformarse en ARNm maduro antes de la traducción). El principio de esta región codificadora viene determinado por la secuencia de bases TAC y su final por los tripletes ATT, ATC o ACT, y que reciben el nombre de tripletes sin sentido, de paro o de stop.
- Región terminadora. Es la región que contiene las señales que determinan el final del proceso de transcripción, evitando que continúe hacia otros genes que se encuentran más adelante.

Además de los genes, en el genoma hay pseudogenes y fragmentos de genes: copias defectuosas de secuencias de bases relacionadas con algún gen pero que carecen de función. Se calcula la existencia de unos 20.000 pseudogenes en el genoma humano.

Transcripción y traducción (fig. 3)

EL ADN se transcribe a ARNm y éste se traduce a proteínas. Este principio constituye el dogma central de la biología molecular. En las células eucariotas, los procesos de transcripción y de traducción son 2 procesos independientes separados en el tiempo y en el espacio, ya que la transcripción se produce en el núcleo y la traducción se produce en el citoplasma.

Transcripción

El proceso de síntesis del ARN a partir del ADN constituye la transcripción de la información genética. Su inicio se produce cuando la ARN polimerasa se fija a la región promotora del gen y provoca que la doble hélice se abra en la zona que se va a realizar la transcripción. Posteriormente, se produce la fase de alargamiento: la ARN polimerasa reconoce la secuencia de inicio TAC de la región codificadora y comienza la síntesis de un ARNm precursor en dirección $5' \rightarrow 3'$, de manera que toma como molde una cadena de ADN que va en dirección $3' \rightarrow 5'$. Cuando el enzima lleva leídos unos 30 nucleótidos se añade al ARN que se está formando una cabeza líder en el extremo $5'$ útil para evitar la degradación del ARNm. Tras formarse el ARNm precursor o inmaduro éste presenta 2 modificaciones básicas:

- En el caso de los genes que contienen múltiples exones, este transcrito primario contiene las secuencias complementarias, tanto de los exones como de los intrones del gen. El transcrito primario de ARN presenta un proceso de corte y empalme (*splicing*) del ARN: una serie de reacciones por las que los segmentos de ARN intrónico son seccionados y eliminados, y los segmentos de ARN exónico se van juntando uniéndose un cabo a otro (empalme), dando origen a un segundo transcrito de ARN que es más corto.
- La adición de una cola PoliA.

Tras éstas, el ARNm se puede considerar maduro y puede comenzar la fase de traducción.

Traducción

La síntesis de proteínas se realiza en los ribosomas en el citoplasma de la célula y participan, como ya sabemos, los 3 tipos de ARN. El ARNm lleva la información del ADN desde el núcleo hasta el citoplasma, el ARNr lleva los aminoácidos que se encuentran en el citoplasma a los ribosomas y al ARNm, y el ARNr forma parte de los ribosomas. La traducción se realiza siempre en dirección $5' \rightarrow 3'$, y se efectúa en 4 etapas, que no se van a describir.

Regulación de la expresión génica

El proceso de transcripción del ADN a ARNm y de traducción del ARNm a proteína está altamente regulado. Esta regulación de la expresión génica se inicia en la cromatina y finaliza en la regulación de la vida media de la proteína. En este sentido, las primeras modificaciones que pueden afectar a la expresión génica se producen a nivel epigenético. La acetilación de las histonas o la metilación del ADN pueden inhibir la unión de la ARN polimerasa con el promotor del gen

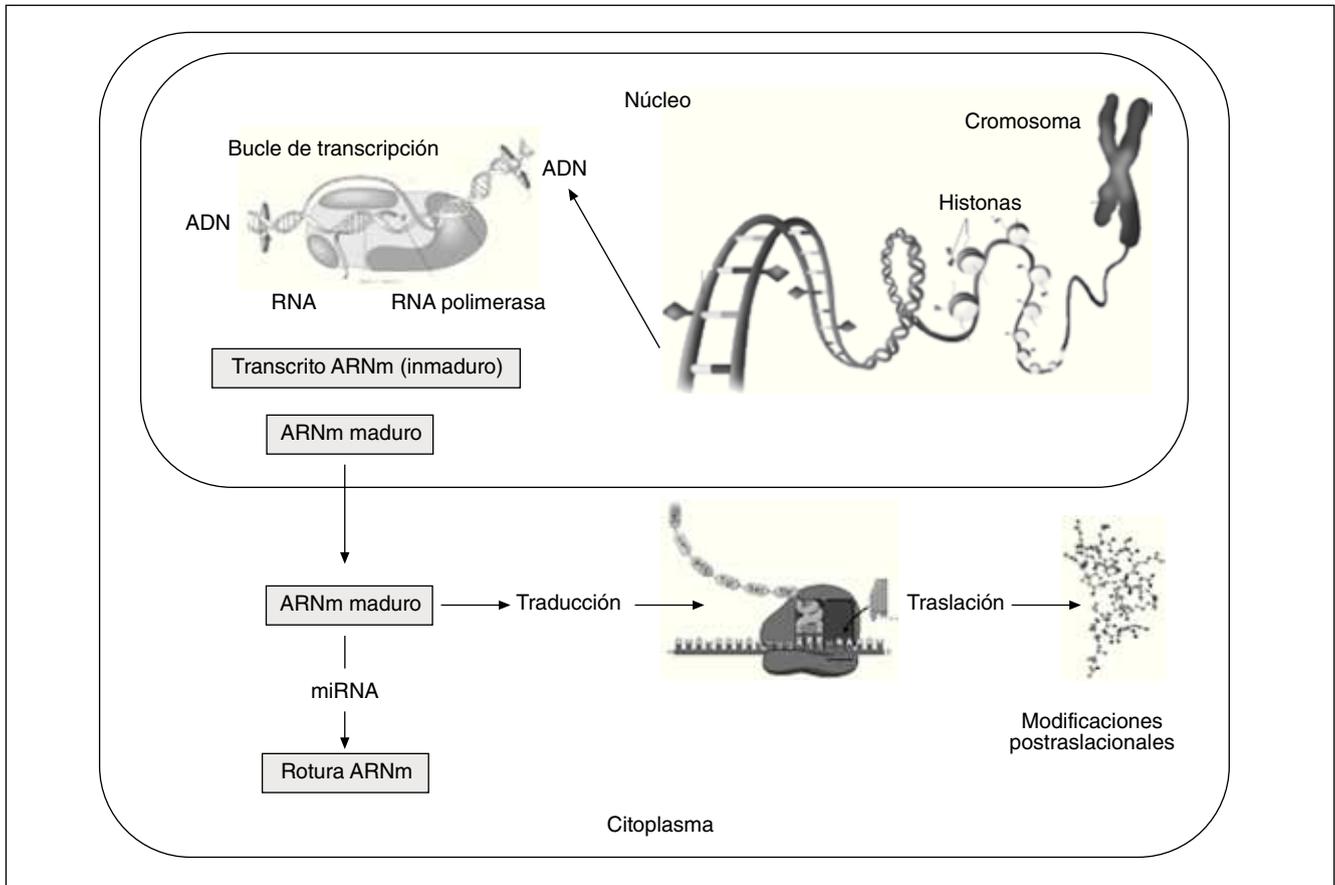


Figura 3 Expresión génica. Transcripción, traducción y posibilidades de regulación de la expresión génica (v. texto).

inhibiendo la transcripción. La iniciación de la transcripción es uno de los elementos básicos de regulación; en efecto, la unión de la RNA polimerasa al promotor puede activarse o reprimirse por proteínas reguladoras que se fijan al gen. Una vez formado el transcrito primario, se produce el *splicing* y el ARN maduro es trasladado al citoplasma. A este nivel, la regulación se produce fundamentalmente por la propia secuencia del ARN que determina su labilidad o no para la degradación, por el tamaño de la cola de poliA y por unas moléculas de ARN de pequeño tamaño denominadas micro-ARN (miARN) que son complementarias a algunos ARN y pueden facilitar la degradación del ARN. Además de esta fina regulación de la expresión génica, una vez formada la proteína se producen diferentes modificaciones postraslacionales que pueden influir en la propia expresión del gen.

Epigenética

La epigenética se puede definir como la información no ligada directamente a la secuencia de ADN que es heredable durante la división celular⁴. El ADN forma una especie de fibra de gran longitud que se empaqueta con el fin de alojarse en el núcleo celular. El envoltorio que forma el ADN dentro del núcleo recibe el nombre de cromatina, y los mecanismos y modificaciones que presentan el ADN y su envoltorio serían las modificaciones epigenéticas, que en último término deciden qué funciones están activadas y cuáles in-

activadas en cada tipo de célula. Mientras la genética de una persona no es fácilmente modificable, la epigenética es más dinámica. Un aspecto interesante es el hecho de que la epigenética puede, en parte, explicar la observación de que aunque 2 personas tengan la misma mutación genética una desarrolle una enfermedad y la otra no. En múltiples enfermedades genéticamente complejas, la patogenia de éstas se basa en la combinación de factores genómicos, epigenéticos y medioambientales. Las alteraciones epigenéticas se han descrito, fundamentalmente, en el cáncer, pero también se sospecha su participación en algunas enfermedades autoinmunes. Los tipos de cambios epigenéticos más frecuentes incluyen la metilación de la citosina del ADN así como la metilación, acetilación y fosforilación de las proteínas histonas que conforman la cromatina. La metilación más estudiada es una modificación del ADN, en la que un grupo metilo es transferido desde S-adenosilmetionina a una posición C-5 de citosina por una ADN-5 metiltransferasa. La metilación del ADN ocurre, casi exclusivamente, en dinucleótidos CpG, teniendo un importante papel en la regulación de la expresión génica.

Concepto de genómica y ciencias relacionadas

El genoma debe ser entendido como la totalidad de la información genética almacenada en el ADN de las células. Cada

persona tiene su propio genoma, el cual guarda una gran similitud (99,8%) con todos los de su propia especie, habiendo diferencias escasas con especies cercanas, como el chimpancé. Esa información, que se encuentra almacenada en todas y cada una de sus células y que le identifica como ser único e independiente, es lo que conocemos como su patrimonio genético o genoma. El genoma humano ha sido recientemente descifrado en más del 99% de su totalidad, gracias al esfuerzo de un consorcio público internacional y una empresa privada^{2,3}.

Se define como genómica a la disciplina que estudia de forma sistemática las secuencias completas de ADN (genoma) de los seres vivos. Tiene como objetivo catalogar todos los genes que tiene un organismo, estudiar la organización y estructura de cada uno de ellos, descubrir su función, los mecanismos implicados en la regulación de la expresión y el modo en que unos genes interaccionan con otros. La genómica permite el estudio conjunto de los miles de genes, proteínas y metabolitos que constituyen un organismo, así como las complicadas redes de interacciones que entre ellos se establecen en el interior de las células durante su ciclo vital.

Una vez completada la secuenciación del genoma, la determinación de las funciones de los genes es el aspecto crítico. Un concepto clave en la genómica funcional es la expresión del genoma para producir el ARNm y las consiguientes proteínas. Puesto que el proceso por el que ADN produce el ARNm se llama transcripción, al ARNm concreto derivado de un ADN se llama transcrito, y al conjunto de ARNm presente en una célula como resultado final de los procesos de transcripción, procesamiento y recambio del ARNm se llama transcriptoma. Aunque son muchos los métodos para estudiar el transcriptoma, el más utilizado es el *microarray* de ADN, que permite el análisis simultáneo de la expresión de miles de genes. De esta manera, se pueden identificar, de forma simultánea, patrones de expresión de miles de genes en un momento del desarrollo o en respuesta a diferentes estímulos ambientales. El análisis bioinformático de estos datos permite asociar grupos de genes que se expresan de forma coordinada y proporciona información importante acerca de su función. Por último, al conjunto de proteínas formadas existente en la célula le llamamos proteoma. La proteómica se define como el estudio del proteoma o conjunto de todas las proteínas presentes en una célula concreta en un momento determinado. A diferencia del genoma, que es idéntico en la mayoría de las células de un organismo, el transcriptoma y el proteoma son muy variables, distintos para cada tipo de células, en respuesta a las influencias del ambiente que los modifica. Son ellos los que determinan la función y el funcionamiento de las células. El proteoma muestra variaciones dependiendo del estadio de desarrollo, el órgano, el gasto metabólico, la salud del organismo, etc. Puesto que las proteínas se encuentran organizadas y expresadas en sistemas que interactúan, su estudio puede ser muy complicado. Mientras que el genoma no revela los detalles de la función de una célula, el estudio del proteoma tiene exactamente ese objetivo. En los estudios de proteómica a gran escala se puede detectar la composición y la estructura de las proteínas, los cambios conformacionales, las alteraciones moduladoras durante el desarrollo, las modificaciones postranscripcionales y pos-

traduccionales (fosforilación, glucosilación, etc.), las interacciones con otras proteínas o con fármacos, etc. Relacionada con la proteómica está la metabolómica, que estudia el estado metabólico de fluidos y preparados tisulares empleando espectroscopia de resonancia magnética nuclear de alta resolución en combinación con análisis estadístico. El estudio del conjunto de metabolitos presentes en un momento determinado puede suministrar información relevante acerca del fenotipo de un organismo. Los metabolitos son los verdaderos productos finales de la transcripción génica y reflejan de forma más exacta la actividad celular o fenotipo funcional. Por lo tanto, es probable que el metabonoma sea el “escenario” más adecuado para el estudio de los procesos celulares en situaciones tanto fisiológicas como patológicas.

Farmacogenómica y farmacogenética

A pesar de que los fármacos actuales cumplen criterios estrictos de seguridad y eficacia, la respuesta de los pacientes y la potencial aparición de efectos secundarios no siempre son predecibles. De hecho, las reacciones adversas a los fármacos causan un número relativamente alto de hospitalizaciones, sobre todo en pacientes geriátricos. Esta variabilidad en la respuesta farmacológica se debe a variaciones en los genes implicados en el metabolismo de los fármacos y/o en otros genes cuyas proteínas codificadas interaccionan con la actividad del fármaco. Algunas observaciones empíricas han ido documentando la asociación de determinados polimorfismos genéticos, a veces presentes en mayor proporción en algunos grupos étnicos, con respuestas a fármacos que se ven relativamente alteradas con respecto al patrón considerado normal. Durante el año 2007, la Agencia Europea del Medicamento definió los conceptos de farmacogenética y farmacogenómica:

- *Farmacogenética*. Es el estudio de la relación entre las variaciones en la secuencia del ADN y la respuesta a fármacos; es decir, la base genética de las diferentes respuestas de los pacientes a un mismo fármaco.
- *Farmacogenómica*. Es el estudio de la relación entre las variaciones en las características del ADN y ARN y la respuesta a los fármacos, y por otro lado la identificación de nuevas dianas terapéuticas mediante herramientas genómicas.

La posibilidad de asociar un polimorfismo genético con la capacidad de respuesta a un determinado medicamento permitirá determinar el tipo de metabolismo y riesgo de toxicidad o de fracaso terapéutico, diferenciando a cada paciente como individuo “respondedor” o “no respondedor” por su perfil molecular^{5,6}. Esta determinación previa permitirá la elección del fármaco adecuado y la dosis óptima, lo que supondrá un ahorro de tiempo y recursos económicos, un cambio cualitativo y cuantitativo en el desarrollo y prevalencia de las enfermedades y, en definitiva, una mejor asistencia sanitaria.

La aplicación de la farmacogenómica en el sistema sanitario podría contribuir a la reducción de costes totales a medio plazo, principalmente por la reducción de los costes

asociados a la administración de un fármaco o una dosis no adecuados. Actualmente, los estudios de asociación con polimorfismos de una sola base (SNP, *single nucleotide polymorphisms*) de todo el genoma (GWA, Genome Wide Association) con chips de muy alta densidad de SNP se están demostrando bastante eficaces para la identificación de genes involucrados en enfermedades complejas^{7,8}.

Otros factores relacionados con la variabilidad en la respuesta a los fármacos son la epigenética, el silenciamiento de genes o la interferencia de ARN que, en general, son el resultado de la interacción del genoma con el entorno. En los últimos años, el concepto del SNP como marcador universal para la farmacogenómica se ha ido sustituyendo por el de otro marcador más, incorporándose de forma paulatina otros marcadores genéticos, proteicos y metabólicos para aumentar la fiabilidad de los tests farmacogenómicos. La mayor parte de los biomarcadores de respuesta a fármacos de usos habituales y aprobados por las agencias reguladoras son a nivel de expresión, así como biomarcadores a nivel de variantes en genes de enzimas metabolizadoras (y menos frecuentemente otros genes relacionados con el transporte o el mecanismo de acción). Un ejemplo clásico es el perfil molecular respecto a la capacidad de la enzima tiopurinmetiltransferasa, capaz de predecir la potencial toxicidad a la azatioprina.

En resumen, tanto la farmacogenética como la farmacogenómica pueden:

- Contribuir a una mejor selección de posibles candidatos a un determinado fármaco, identificando de forma más adecuada candidatos de riesgo y/o de eficacia.
- Mejorar la eficiencia de los ensayos clínicos y adecuar los criterios de inclusión y exclusión.
- Mejorar criterios de inclusión/exclusión.
- Finalmente, proveer un tratamiento más específico y menos tóxico, es decir, tender hacia la individualización de la terapia.

Variabilidad genética y enfermedad

Desde la antigüedad se conoce la existencia de enfermedades hereditarias, aunque el mecanismo íntimo se empieza a conocer en este momento. En el año 2004, el International Human Genome Sequencing Consortium hizo pública la secuencia completa del genoma humano. Uno de los hechos más relevantes es el número relativamente pequeño de genes codificantes (entre 20.000 y 25.000), aproximadamente, el 1,5% del genoma completo. Este dato sugiere que la complejidad genética de la especie no se basa en el número de genes sino en la funcionalidad de éstos⁹. La fiabilidad en la replicación del ADN es muy alta, pero se pueden producir modificaciones; el resultado es una combinación única, en la que está escrita esa individualidad genética. No hay una única secuencia y estructura del genoma humano (International HapMap Consortium). Las alteraciones genéticas que afectan a más del 1% de la población se denominan polimorfismos genéticos, entre los que se incluyen:

- Las mutaciones puntuales de una sola base (o SNP) que se producen de forma espontánea o inducida en cualquier

región del genoma. Ésta es la variedad más frecuente de polimorfismo. Una mutación puede ocasionar efectos perjudiciales, beneficiosos o ser neutra; en muchas ocasiones se han relacionado con la respuesta a fármacos. La probabilidad de presentar un SNP es de 1 cada 1.250 bases, estimando que puede haber más de 12 millones de SNP.

- En ocasiones, los cambios no afectan únicamente a 1 base, sino que el cambio es más extenso. Por ejemplo, los microsatélites (repeticiones cortas en tándem) son segmentos repetitivos de ADN que comprenden de 2 a 5 nucleótidos dispersos por todo el genoma en las regiones no codificadoras que hay entre o dentro de los genes (intrones). En ocasiones interfieren con el proceso replicativo. Se utilizan frecuentemente como marcadores en el análisis de ligamiento debido a que el número de repeticiones es polimórfico entre los individuos de una población. Pero además de estos cambios que hemos apuntado, cerca de la mitad del genoma humano es de alguna forma transponible, lo que hace que la variabilidad genética sea inmensa. Otro mecanismo implicado en la variabilidad genética es la recombinación genética. Por último, no debemos olvidar la posibilidad de variaciones mucho menos frecuentes, como las alteraciones en el número o estructura de los cromosomas, que determinan per se graves alteraciones fenotípicas.

El análisis de las pequeñas variaciones genéticas presentes en un porcentaje alto de la población se efectúa fundamentalmente mediante los estudios de asociación a gran escala (GWA: *genome wide association*) que buscan asociaciones entre las variaciones de la secuencia de ADN y ciertos fenotipos de interés. Se estudian individuos con fenotipos concretos y se determina su genotipo en los cientos de miles de posiciones de SNP. Dentro de los individuos pertenecientes a un determinado grupo, los SNP con un tipo de variante genética estadísticamente más frecuente que en los casos control se consideran como asociados a ese fenotipo. Después de varios años de estudios de asociación a gran escala, se han detectado más de 300 asociaciones con 70 enfermedades comunes. Un proyecto estrella, el HapMap, tiene como objetivo la construcción de mapas de haplotipos (combinaciones de alelos que se heredan juntos a lo largo de generaciones) estudiando los SNP y sus frecuencias¹⁰.

Al igual que hemos definido con anterioridad la existencia de pequeñas y grandes variaciones en la secuencia genética, desde un punto de vista conceptual, la relación entre genes y enfermedad también puede agruparse en 2 grandes tipos (fig. 4):

- Enfermedades que se producen como consecuencia de una alteración en la función de un solo gen dando lugar a un fenotipo patológico; éstas son las *enfermedades monogénicas*. El resto del genoma y la epigenética tienen escasa influencia en el desarrollo de la enfermedad. En general, la prevalencia de estas enfermedades es muy baja (constituyen la inmensa mayoría de las denominadas enfermedades raras, con una prevalencia inferior a 5 casos por 10.000 personas).
- La mayor parte de las enfermedades de elevada preva-

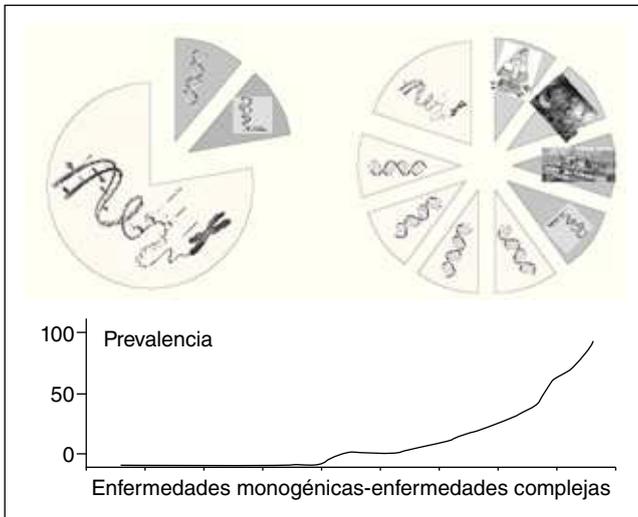


Figura 4 Diferente influencia de los factores genéticos y ambientales en las enfermedades monogénicas y en las enfermedades genéticamente complejas.

lencia (diabetes, aterosclerosis, esteatohepatitis, cáncer, etc.) son *genéticamente complejas*. En este caso, varias alteraciones genéticas (polimorfismos), generalmente asociadas a alteraciones epigenéticas y factores ambientales (dieta, ejercicio físico, exposición medioambiental, etc.), contribuyen al fenotipo patológico, pero ninguno en exclusiva.

Genómica y medicina personalizada

La medicina genómica y personalizada es la disciplina que permitirá el empleo de las tecnologías de genética molecular (genómica, proteómica, etc.) para diagnosticar y tratar de forma individualizada a cada paciente, respecto a la salud y enfermedad, basándose en el conocimiento de su genoma (fig. 5). Este enfoque incluye el estudio de la variabilidad genética y los perfiles de expresión de los genes, las proteínas y los metabolitos. Toda la información biológica se correlacionará con los datos epidemiológicos y clínicos, como la prevalencia de la enfermedad, los factores ambientales, el conocimiento acerca de la enfermedad, el tratamiento, el pronóstico y la respuesta a los fármacos. El cambio de la medicina actual (reactiva, curativa y orientada en síntomas) a una medicina individualizada (predictiva, preventiva y orientada a riesgos) se producirá, probablemente, de una forma gradual, siendo ambas en gran medida complementarias. Los grandes objetivos de la medicina personalizada son: *a*) el conocimiento desde un punto de vista molecular de las causas de las enfermedades; para lograr este objetivo es imprescindible el uso de la genómica funcional tal y como se ha descrito con anterioridad (combinación de genómica, proteómica y metabolómica); *b*) la profundización en la individualidad genética de cada persona; tras establecerse el patrón genómico de la especie permitirá predecir algunas enfermedades y, en cualquier caso, lograr un diagnóstico

más certero y precoz, y *c*) gracias a la combinación de la farmacogenética y de la farmacogenómica se podrá disminuir la incidencia de algunos efectos secundarios y utilizar fármacos que, de forma altamente selectiva, sean capaces de corregir o neutralizar el o los defectos genéticos causantes de la enfermedad.

Tras el éxito de grandes proyectos, como el Genoma y el Hapmap, se han iniciado otros grandes proyectos destinados a explorar la relación entre variantes genéticas seleccionadas y la predisposición a las enfermedades, diagnóstico y respuesta a los fármacos. Uno de estos proyectos es la gEUVADIS (Genetic European Variation in Disease), iniciativa europea multidisciplinaria que tiene por objeto consolidar los conocimientos en medicina genómica. Los objetivos de gEUVADIS son: *a*) establecer guías comunes a todos los niveles en la investigación genómica en enfermedades humanas (comunes y raras); *b*) generar una descripción completa de la gama de variaciones genómicas de procesos clínicos de importancia para Europa, y *c*) generar una descripción funcional completa de la variabilidad genética de las principales enfermedades que afectan a la población europea. Para conseguir estos objetivos tan ambiciosos, es precisa una estrecha relación entre gEUVADIS y algunas megaestructuras, como el Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure (BBMRI), una red europea de biobancos y recursos biomoleculares. Otros proyectos de similar envergadura son el Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC) en el Reino Unido, o el GAIN en Estados Unidos.

Genética y enfermedades hepáticas

Al igual que en otras patologías, la variabilidad genética juega un papel clave en múltiples enfermedades hepáticas. Por otro lado, es obvio el interés de los hepatólogos en la genómica como herramienta para una caracterización completa de diferentes enfermedades hepáticas. En este sentido, la colaboración del CIBERehd con la empresa CICbioGUNE, que permite a los miembros del CIBERehd el acceso a plataformas tecnológicas de genómica, proteómica, metabolómica y silenciamiento génico, y el acuerdo con el Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, para almacenar muestras biológicas (sangre, ADN, suero, plasma, células inmortalizadas y tejidos) avalan el interés estratégico de esta aproximación. Pero, además, muchos miembros de esta red de investigación tienen líneas de investigación en genómica. Sin querer ser exhaustivo, se pueden mencionar: la investigación en la genética molecular de la colestasis intrahepática, con especial hincapié en el estudio del posible papel del intercambiador de aniones AE2 en la etiopatogenia de la cirrosis biliar primaria; la clasificación molecular del carcinoma hepatocelular (mediante *microarray*, *SNP arrays* y *miARN*); la farmacogenética de transportadores de fármacos antitumorales o los mecanismos determinantes de la bioequilibrio de fármacos antitumorales e identificación de pautas de mejora de respuesta terapéutica mediante la modulación específica de las vías de internalización de fármacos. Uno de los ejemplos más claros de aplicación de la genómica en el estudio de enfermedades hepáticas

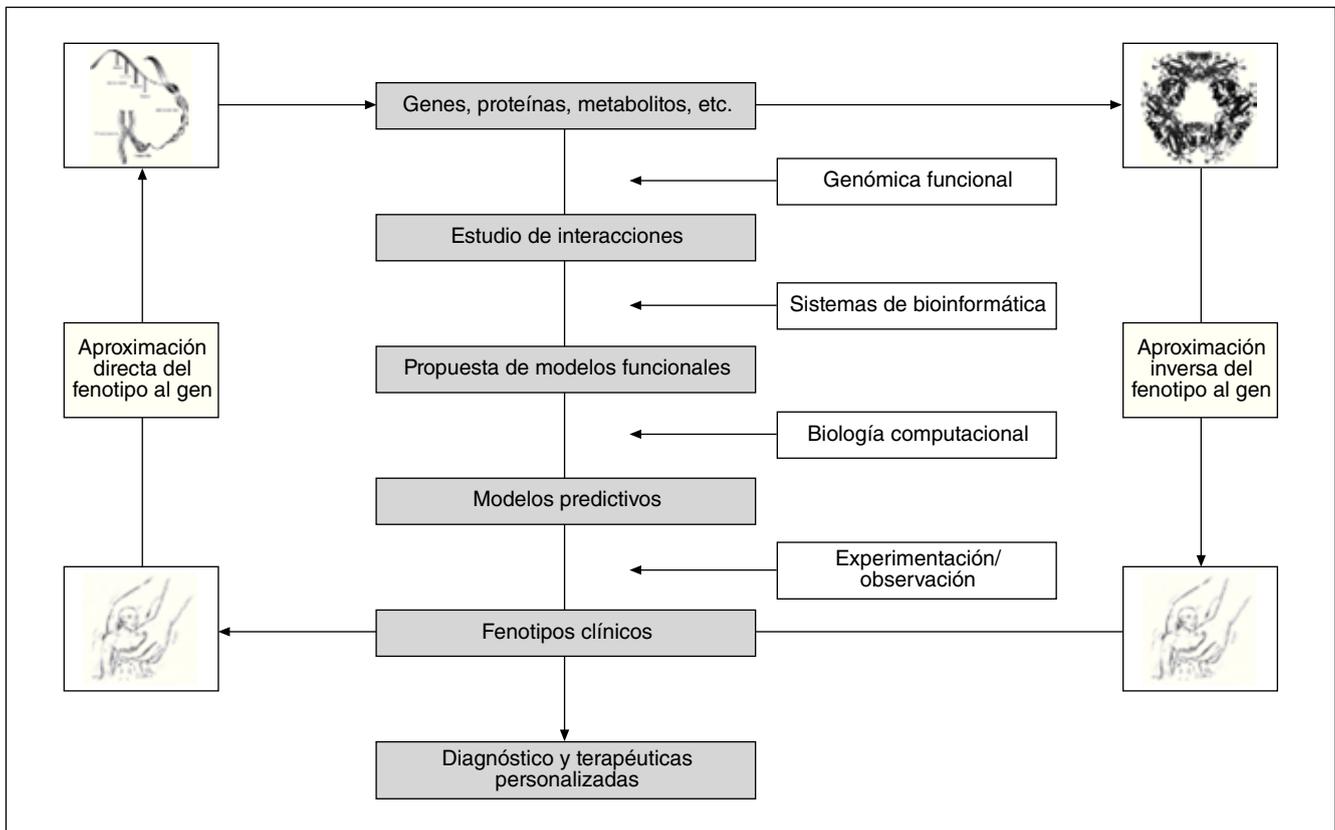


Figura 5 Medicina personalizada y genómica.

lo constituye el grupo BCLC del Hospital Clínic de Barcelona para el estudio de los tumores hepáticos. Este grupo ha hecho una clasificación molecular del hepatocarcinoma basada en la activación de la vía de la Wnt-beta-catenina y la activación de genes involucrados en la proliferación, además de otras alteraciones menos relevantes. Esta clasificación molecular puede permitir, en un futuro próximo, una terapia dirigida en función de las dianas involucradas en cada caso individual, es decir, una medicina personalizada, probablemente más eficaz y menos tóxica^{11,12}. El trabajo liderado por la Dra. Lucena en torno a la caracterización fenotípica de las reacciones idiosincrásicas constituye otra forma de aproximarse al problema, ya que en la actualidad se encuentra involucrado en la investigación de diferentes factores genéticos involucrados en la hepatotoxicidad farmacológica; en este caso, se recorre el camino del fenotipo al genotipo, de forma inversa a la expresada en la búsqueda de una firma molecular en el hepatocarcinoma¹³. Otro ejemplo muy reciente, la descripción de un polimorfismo cercano al gen que codifica para el lambda-3 y que puede explicar, al menos parcialmente, las diferencias en la respuesta al tratamiento antiviral entre blancos y negros. En este caso, la identificación del polimorfismo puede ser útil para establecer una predicción más adecuada acerca de las posibilidades de respuesta antiviral¹⁴. Hay múltiples ejemplos más, pero no es la intención de este artículo su revisión sistemática.

Terapia génica

La terapia génica (TG) se ha desarrollado como un nuevo tratamiento de las enfermedades humanas basado en la transferencia de material genético a las células de un individuo. En general, el material genético introducido debe restaurar una función celular perdida, inducir una función nueva o interferir con una función ya existente y nociva.

Desde el punto de vista teórico hay 2 tipos de TG, la TG de células somáticas y la TG de células germinales, aunque sólo se está desarrollando la primera. La TG somática busca introducir los genes a las células somáticas (esto es, todas las células del organismo que no son gametos o sus precursores), y así eliminar las consecuencias clínicas de una enfermedad genética heredada o adquirida. Las generaciones futuras no son afectadas porque el gen insertado no pasa a ellas. La TG de células germinales ha sido totalmente proscrita por diferentes organismos internacionales (OMS, UNESCO, etc.), ya que al transmitirse los cambios efectuados en ellas a las siguientes generaciones se puede afectar el patrimonio genético de la especie humana, y un error de juicio y/o tecnológico pudiera tener consecuencias imprevisibles. La primera transferencia se realizó en el año 1989 en un paciente con una inmunodeficiencia. Aunque no se encontraron efectos clínicos, tampoco se demostraron efectos deletéreos. En 1990, la TG se usó por primera vez con intención terapéutica en un paciente que padecía una inmunodeficiencia.

ciencia severa por un déficit de adenosina deaminasa. A partir de este momento, la TG ha presentado un desarrollo exponencial. A finales de los noventa se produjo el primer éxito terapéutico: un grupo de niños con inmunodeficiencia combinada severa se trató en Francia mediante la transferencia *ex vivo* a células de su médula ósea de la versión correcta del gen alterado.

Las distintas estrategias de la TG se basan en la combinación de 3 elementos clave: material genético a transferir, método de transferencia y tipo celular que incorporará dicho material genético. En función de la estrategia empleada para transferir el material genético a la célula diana, la TG puede clasificarse en:

- Terapia génica *in vivo*. El material genético se introduce directamente en las células del organismo, sin que se produzca su extracción ni manipulación *in vitro*. Esta técnica es más sencilla, pero el grado de control sobre el material transferido es pequeño, la eficiencia es menor y el grado de especificidad tisular discreto.
- Terapia génica *ex vivo*. Las células que se van a someter a tratamiento se extraen del paciente, se cultivan y se someten al proceso de transferencia *in vitro*. Este tipo de técnica tiene una especificidad absoluta en cuanto al tipo de célula a tratar y la eficacia del proceso de transducción es mayor.

Para que la TG sea eficaz, es necesario introducir de una forma eficiente el gen o la secuencia génica de interés en la célula diana y conseguir su expresión. La acción de transferir el material genético a la célula se conoce como transducción y el gen que se transduce es el transgén. Este objetivo se logra con vehículos o vectores, cuya misión es proteger el material genético de su degradación antes de que alcance el núcleo. Además, es necesario disponer de promotores adecuados para conseguir la máxima expresión del gen insertado en la célula. Los sistemas de transferencia se pueden clasificar en 2 tipos:

- Métodos de transferencia génica fisicoquímicos o no virales. El ADN exógeno está integrado en un plásmido (molécula de ADN estable e independiente del genoma de la célula huésped). Entre las numerosas técnicas destacan la microinyección, la electroporación, el bombardeo con microproyectiles, la inyección directa de ADN “desnudo” y los liposomas. En general, estas técnicas son seguras y poco tóxicas, pero la eficacia de transducción no muy elevada.
- Transferencia mediada por virus. Los vectores virales se obtienen por eliminación de uno o más genes indispensables para la replicación del virus y su sustitución por el gen terapéutico. Los virus recombinantes obtenidos son capaces de penetrar en la célula, hacer que el transgén alcance el núcleo de la célula diana, pero no puede replicarse de forma continua, evitando la infección viral en el paciente. De esta forma, el nuevo virus es deficiente, es decir, mantiene la capacidad de infectar las células pero no es capaz de replicarse. En la actualidad, son los vectores más utilizados en TG, ya que son más eficaces para transferir genes. No obstante, plantea 3 problemas fundamentales: a) la posibilidad de inducir

una infección en el huésped; b) la posibilidad de inducir la activación de un virus patógeno o un oncogen, y c) la respuesta inmune que provoca en el huésped, contribuyendo a la eliminación de las células modificadas genéticamente. El número de virus utilizado es muy amplio, pero los 2 más empleados son los retrovirus y los adenovirus.

Desde el punto de vista técnico, otro aspecto importante consiste en introducir junto al gen terapéutico uno o más genes que permitan:

- Por un lado, insertar un gen que permita identificar y seleccionar las células diana que han sido eficientemente transfectadas.
- Por otro lado, insertar un segundo gen que permita hacer una selección *in vivo* de las células transfectadas y producir su muerte en caso de aparición de complicaciones no deseadas de la TG. Un ejemplo de “gen de seguridad” podría ser la incorporación de la enzima timin-cinasa del virus del herpes simple, que permitirá la muerte de las células transfectadas si se exponen a la acción del ganciclovir.

En la actualidad hay cientos/miles de ensayos clínicos de TG; en este sentido, se han desarrollado o se están desarrollando ensayos de TG frente a hepatocarcinoma, hepatitis virales en caso de fracaso de la terapia antiviral convencional, etc.^{15,16}. Este tema se desarrolla con posterioridad en este mismo número de la revista.

Bibliografía

1. Watson JD, Crick F. The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1953;18:123-31.
2. McPherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A, Wallis J, et al. International Human Genome Mapping Consortium. *Nature.* 2001;409:934-41.
3. Mural RJ, Adams MD, Myers EW, Smith HO, Miklos GL, Wides R, et al. A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome. *Science.* 2002;296:1661-71.
4. Snykers S, Henkens T, De Rop E, Vinken M, Fraczek J, De Kock J, et al. Role of epigenetics in liver-specific gene transcription, hepatocyte differentiation and stem cell reprogramming. *J Hepatol.* 2009;51:187-211.
5. Krauss RM, McLeod HL, Ratain MJ, Relling MV, Ring HZ, Shuldiner AR, et al. Pharmacogenomics: challenges and opportunities. *Ann Intern Med.* 2006;145:749-57.
6. Ingelman-Sunderberg M. Pharmacogenomic biomarkers for prediction of severe adverse drug reactions. *N Engl J Med.* 2008;358:637-9.
7. Kingsmore SF, Lindquist IE, Mudge J, Gessler DD, Beavis WD. Genome-wide association studies: progress and potential for drug discovery and development. *Nature Reviews.* 2008;7:221-30.
8. The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007;447:661-78.
9. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. International Human Genome Consortium. *Nature.* 2004;431:931.

10. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005;437:1299-320.
11. Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008;48:1312-27.
12. Villanueva A, Toffanin S, Llovet JM. Linking molecular classification of hepatocellular carcinoma and personalized medicine: preliminary steps. *Curr Opin Oncol*. 2008;20:444-53.
13. Lucena MI, Andrade RJ, Kaplowitz N, García-Cortés M, Fernández MC, Romero-Gómez M, et al. Spanish Group for the Study of Drug-Induced Liver Disease. Phenotypic characterization of idiosyncratic drug-induced liver injury: The influence of age and sex. *Hepatology*. 2009;49:2001-9.
14. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 2009;461:798-801.
15. Berraondo P, Prieto J, González-Aseguinolaza G. Advances in interleukin-12 gene therapy for acquired liver diseases. *Curr Gen Ther*. 2009;9:62-71.
16. Hernández-Alcoceba R, Sangro B, Prieto J. Gene therapy of liver cancer. *Ann Hepatol*. 2007;6:5-14.