

# Hablemos de...

## Genoma Humano. Oportunidades para la medicina diagnosticopreventiva y terapéutica

RAFAEL OLIVA

Servicio de Genética. Hospital Clínico de Barcelona. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona. Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS).

### Genoma humano

Es de todos conocido el interés creciente de los medios de comunicación en los resultados derivados del proyecto genoma, que nos ha aportado un primer esbozo de la secuencia del genoma humano. Sin duda, el interés proviene, en parte, del hecho de que el genoma humano es el material genético característico de la especie humana. A nivel celular, y en estado haploide, está formado por 3.000 millones de bases presentes en los 23 cromosomas del núcleo celular, más las 16.569 bases del genoma mitocondrial presente en las mitocondrias<sup>1,2</sup>. Además, se tiene que considerar también la variación presente en el genoma de los 5.000 millones de miembros de la especie humana y que supone un 0,1% de variación entre cada dos individuos.

El proyecto genoma ha comportado un extraordinario desarrollo metodológico y la determinación de la secuencia de la mayoría de bases del genoma<sup>3,4</sup>. La determinación de la secuencia ha supuesto en una primera fase la construcción de mapas genéticos y de mapas físicos con una resolución creciente hasta llegar a genotecas ordenadas en forma de cóntigos. Los cóntigos son colecciones de clones que se solapan unos a otros y que cubren la mayor parte del genoma. La secuencia de las bases del genoma se ha podido realizar siguiendo dos estrategias distintas pero complementarias: la secuenciación ordenada de los clones<sup>3</sup>, y la se-

La secuencia del genoma humano está actualmente disponible en la siguiente dirección de Internet: <http://genome.ucsc.edu>

El desciframiento del genoma humano ha evidenciado que contiene aproximadamente unos 35.000 genes, una cifra que se sitúa en el límite inferior de las previsiones iniciales.

Muchos genes humanos proceden directamente de bacterias y de organismos inferiores a través de una transferencia evolutiva horizontal.

Ha quedado confirmado que dos individuos de una raza concreta poseen respectivamente más diferencias que las diferencias características presentes en razas distintas de la especie humana.

cuenciación al azar seguida de su ensamblado por ordenador<sup>4</sup>. El resultado de esta primera fase de la determinación de la secuencia del genoma humano ha aportado un esbozo que cubre el 94% del genoma<sup>3,4</sup>. La secuencia del genoma humano está actualmente disponible a través de Internet, y puede ser consultada por cualquier investigador biomédico en la siguiente dirección: <http://genome.ucsc.edu>.

El análisis inicial de la secuencia del genoma humano ha evidenciado que contiene aproximadamente unos 35.000 genes, una cifra que se sitúa en el límite inferior de las previsiones iniciales<sup>1,2</sup>. Otro de los aspectos interesantes que se derivan del análisis de la secuencia del genoma es que aproximadamente la mitad de éste está formado por secuencias repetitivas. También cabe destacar que muchos genes humanos

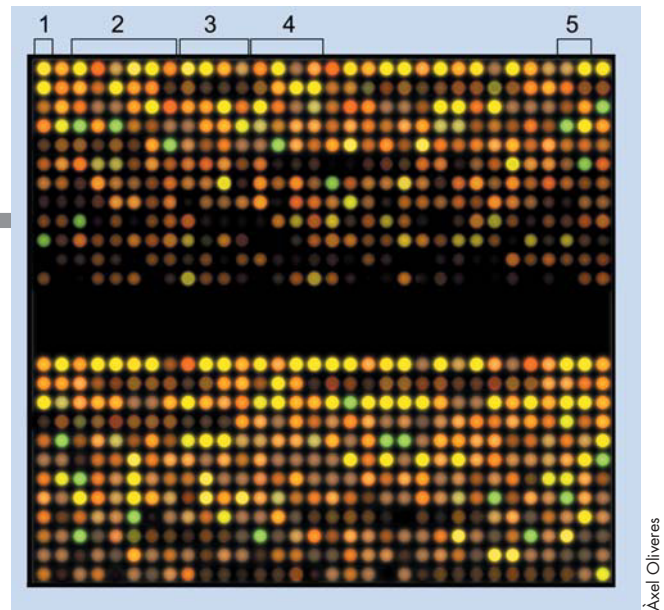
proceden directamente de bacterias y de organismos inferiores a través de una transferencia evolutiva horizontal<sup>3,4</sup>. Respecto a la variación entre individuos, ha quedado confirmado que dos individuos de una raza concreta poseen, respectivamente, más diferencias que las diferencias características presentes en razas distintas de la especie humana. A parte de todos estos aspectos básicos de evolución del genoma humano y de la especie humana, la disponibilidad de la secuencia del genoma está confiriendo un fuerte impulso en toda la investigación biomédica<sup>5</sup>.

## Investigación y búsqueda de información de enfermedades con base génica

Hoy día ya se conocen las causas de más de 1.000 enfermedades con base hereditaria<sup>6</sup>. La etiología génica de estas enfermedades hereditarias se determinaba en un pasado a través de métodos muy laboriosos que solían requerir años. Estos métodos solían consistir, o bien en la identificación de la alteración bioquímica hasta llegar a dar con el gen, o bien en la realización de estudios de ligamiento seguidos de una laboriosa clonación y secuenciación de numerosos genes. La disponibilidad de la secuencia del genoma aporta ahora una obra de referencia que facilitará el descubrimiento de la causa de un gran número de enfermedades con base génica cuya etiología sigue desconocida. Por ejemplo, dada una familia con diversos miembros afectados, y habiendo identificado a través de ligamiento una región genómica, actualmente es posible proceder directamente a la secuenciación de genes candidatos de la región genómica en los enfermos. El gen mutante puede identificarse entonces a través del estudio comparativo de la secuencia de los enfermos con la secuencia de referencia normal<sup>3,4</sup>. Una de las herramientas que permite la búsqueda de secuencias similares o idénticas a una secuencia de interés es el programa denominado BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponible a través de Internet en la siguiente dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Como ejemplos en los que el primer borrador del genoma humano ha facilitado el descubrimiento de genes mutantes cabe distinguir el gen *BRCA2* asociado a diversos cánceres<sup>7</sup>. Otras estrategias disponibles actualmente en la investigación biomédica de enfermedades con base hereditaria corresponden al estudio de genes candidatos a través de estudios de asociación caso-control. Así, por ejemplo, se identificaron diversas asociaciones en la enfermedad celíaca<sup>8,9</sup>.

Hoy día, cualquier clínico puede buscar información sobre cualquier enfermedad con base hereditaria a través de Internet en OMIM (*On line Mendelian Inheritance in Man*). <http://ncbi.nlm.nih.gov/Omim>



Áxel Oliveres

Una consecuencia de la rapidez actual con la que se producen los avances en biomedicina y del gran número de enfermedades hereditarias existentes es que resulta difícil mantenerse al día. Por tanto, resulta crucial conocer cuáles son las alternativas disponibles para buscar información actualizada. De forma práctica, cualquier clínico puede buscar información sobre cualquier enfermedad con base hereditaria a través de Internet en OMIM (*On line Mendelian Inheritance in Man*)<sup>6</sup>. La dirección web correspondiente es la siguiente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>.

Se trata de una base de datos, actualizada semanalmente, en la cual es posible realizar una búsqueda por palabras clave. El resultado aporta una revisión, incluyendo las referencias originales, y una sinopsis clínica de cada enfermedad. Como índice de la relevancia actual de la genética en el campo de la gastroenterología, cabe citar el número de documentos detectados en la base de datos OMIM haciendo servir las siguientes palabras clave: *stomach*, 183 documentos; *intestine*, 466 documentos; *colon*, 482 documentos; *liver*, 1.863 documentos, y *páncreas*, 623 documentos. Cada uno de estos documentos corresponde, o bien a una enfermedad con base génica que cursa con afectación del órgano referido, o bien a genes que se expresan en el órgano referido y por los que hay evidencia de relación patogénica.

Sin duda existen también otras alternativas en la búsqueda de la información relativa a una enfermedad concreta tales como la consulta de la base de datos Medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>) o la consulta de los textos especializados.

## Aplicación en la medicina

El descubrimiento de las mutaciones de un gen responsables de una determinada enfermedad hereditaria permite realizar un diagnóstico etiológico en la práctica clínica. Además, es bien sabido que el conocimiento de una etiología aporta un pronóstico y abre las puertas a la prevención y/o a un tratamiento mucho más efectivo. En el ámbito práctico, resulta importante tener claro qué es lo que se requiere para diagnosticar a escala molecular una enfermedad después de su sospecha clínica.

El primer paso en el proceso de análisis genético suele consistir en la obtención de una muestra de sangre venosa anticoagulada en EDTA que se envía al laboratorio de análisis genéticos. También es posible hacer servir otro tipo de muestras tales como material procedente de biopsias o fluidos corporales. Normalmente cada laboratorio de genética se especializa sólo en algunas enfermedades hereditarias. Por tanto, resulta esencial determinar dónde podemos remitir las muestras para su análisis. En este sentido, resulta útil la consulta a través de Internet de las bases de datos EDDNAL (*European DNA Laboratories*) y de la Sociedad Española de Gené-

tica Humana (AEGH): <http://www.eddnal.com/> y <http://www.uam.es/otros/AEGH/paginas/>.

Estas dos bases de datos proporcionan las direcciones de contacto, o incluso de correo electrónico, de los distintos centros. Así es posible pedir información de costos y requerimientos para el envío de muestras. Una vez las muestras de sangre o de otro tipo son recibidas en el laboratorio de análisis genético, suele procederse a la extracción del ADN y a la amplificación del gen de interés a través de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR<sup>10</sup>. Se plantean entonces distintas posibilidades técnicas. En algunos casos, la observación directa del producto de PCR después de su electroforesis ya resulta diagnóstico. Por ejemplo, la detección de amplificación de secuencias del microorganismo *Helicobacter pylori* en un paciente con problemas gástricos suele ser diagnóstico de la etiología<sup>11,12</sup>.

En enfermedades que se producen por mutaciones puntuales dispersas en cualquier exón del gen suelen emplearse diversas técnicas (SSCP, DGGE) o incluso la secuenciación

## Nuevas oportunidades para la medicina diagnosticopreventiva y terapéutica

Uno de los aspectos importantes del proyecto genoma es que ha impulsado el desarrollo de nuevas tecnologías de análisis genético. Dos de éstas corresponden a los *microarrays* y al *DNA chip*. Un *microarray* es básicamente una colección de fragmentos de cADN de genes de secuencia conocida unidos de forma covalente sobre una superficie, que con frecuencia suele ser la de un portaobjetos. A través de la hibridación de ARN marcados procedentes de una célula o tejido es posible determinar qué genes se están expresando en esta célula o tejido. El principio del chip de ADN es similar aunque su finalidad es distinta. El chip de ADN consta básicamente de oligonucleótidos de secuencia conocida unidos sobre una superficie. Analizando en qué posición hibrida un producto de PCR sobre el chip es posible determinar la secuencia existente en el producto de amplificación.

Un *microarray* es básicamente una colección de fragmentos de cADN o de genes de secuencia conocida unidos de forma covalente sobre una superficie. A través de la hibridación de ARN marcados procedentes de una célula o tejido es posible determinar qué genes se están expresando en esta célula o tejido.

El chip de ADN consta básicamente de oligonucleótidos de secuencia conocida unidos sobre una superficie. Analizando en qué posición hibrida un producto de PCR sobre el chip es posible determinar la secuencia existente en el producto de amplificación.

ticados sin falsos positivos<sup>17</sup>. La tecnología del ADN chip también ha sido aplicada en la detección de mutaciones del gen de la fibrosis quística, en la detección de polimorfismos en el VIH, en la detección de polimorfismos en el ADN mitocondrial y en la detección de mutaciones en la betatalesmia. Se prevé que el chip de ADN también puede resultar muy útil en la detección de variación de los genes responsables del metabolismo y respuesta diferencial de los distintos individuos a un mismo fármaco. En este sentido, se ha creado el término de "farmacogenómica" (surgido de la farmacogenética) referente a la aplicación de las tecnologías de análisis genómico en el desarrollo y uso futuro más racional de fármacos<sup>18,19</sup>. La farmacogenómica engloba básicamente los dos aspectos descritos en las secciones anteriores. La detección de variación presente en distintos individuos a través de chips de ADN u otros métodos puede permitir determinar su relación con la respuesta a fármacos<sup>20</sup>. Los individuos responden de forma distinta a los fármacos porque son heterogéneos genéticamente. Esta heterogeneidad resulta en que, en algunos individuos, un fármaco no ejerce ningún efecto, mientras que en otros individuos presenta efectos indeseables. En un futuro es previsible que el genotipado preceda a la administración de un fármaco, de tal forma que a cada individuo se le pueda adminis-

## Bibliografía



● Importante ●● Muy importante

1. Oriola J, Oliva R. Genoma humano y estructura básica de los genes. JANO 2001;61:720-2.
2. Oliva R. Genoma Humano. Masson SA, 1996.
3. ●● Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001;409:860-921.
4. ●● Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. Science 2001;291:1304-51.
5. Oliva R, Ballesta F, Bruguera M, Carreras E, Carrió A, Casademont J, Claria J, et al. Monográfico: Genética Básica. JANO 2001;61:719-1039.
6. McKusick. On line Mendelian Inheritance in Man. OMIM 2002; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>.
7. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature 1995;378:789-92.
8. Clot F, Babron MC. Genetics of celiac disease. Molecular Genetics & Metabolism 2000;71:76-80.
9. Ruiz MY, Olivares JL. Three-loci HLA haplotypes in Spanish celiac children and healthy subjects: estimation of linkage disequilibrium and haplotype frequencies. Am J Gastroenterol 2001;96:1455-9.
10. Claria J, Sánchez M, Queralt R. Herramientas básicas de análisis genético. JANO 2001;61:731-40.
11. Caselli M, Parente F, Palli D, Covacci A, Alvisi V, Gasbarrini G, et al. The Cervia Working Group. "Cervia Working Group Report": guidelines on the diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection. Digestive & Liver Disease 2001;33:75-80.
12. Bravos ED, Gilman RH. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Other tests. Gastroenterol Clin N Am 2000;29:925-9.
13. Guillem JG. Molecular diagnosis of hereditary nonpolyposis colon cancer. N Engl J Med 1998;339:924-5.
14. Sánchez M, Bruguera M, Bosch J, Rodés J, Ballesta F, Oliva R. Prevalence of the HFE Cys282Tyr and His63Asp gene mutations in Spanish patients with hereditary hemochromatosis and in controls. J Hepatol 1998;29:725-8.
15. Oliva R, Sánchez M, Bruguera M, Rodés J. Utilidad clínica de la detección de mutaciones del gen HFE en la hemocromatosis. Gastroenterol Hepatol 2000;23:433-5.
16. Meijers-Heijboer EJ, Verhoog LC, Brekelmans CT, Seynaeve C, Tilanus-Linthorst MM, Wagner A, et al. Presymptomatic DNA testing and prophylactic surgery in families with a BRCA1 or BRCA2 mutation. Lancet 2000;355:2015-20.
17. Hacia JG, Brody LC, Chee MS, Fodor SPA, Collins FS. Detection of heterozygous mutation in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. Nat Genet 1996;14:441-7.
18. ● Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. Science 1999;286:487-91.
19. ● Cantor CR. Pharmacogenetics becomes pharmacogenomics: wake up and get ready. Mol Diag 1999;4:287-8.
20. ● Melton L. From DNA to drugs. Mol Med Today 1999;5:468-9.
21. ●● Debouck C, Goodfellow PN. DNA microarrays in drug discovery and development. Nat Genet 1999;21(Suppl): 48-50.
22. Oliva R, Bruguera M, Escolar G, Carreras E. Tratamiento de las enfermedades genéticas. JANO 2001;61:1033-9.

ción directa del supuesto gen mutante. Así es posible, por ejemplo, identificar las mutaciones de los genes asociados al cáncer de colon no-polipósico<sup>13</sup>. Los resultados del estudio genético suelen aportar una información diagnóstica molecular. La utilidad de esta información depende del tipo de enfermedad.

En otros casos la detección presintomática de la alteración molecular sirve para prevenir la aparición de enfermedad. Por ejemplo, la detección de la mutación homocigota C282Y del gen *HFE* en una persona joven permite controlar los valores de hierro a través de flebotomías periódicas y, de esta forma, evitar la posible aparición de una cirrosis y cáncer de hígado, entre otras alteraciones<sup>14,15</sup>. En los casos de enfermedades letales o muy graves e incapacitantes a edad temprana, es posible utilizar la información molecular para el diagnóstico preimplantacional o prenatal. En otros casos, la detección de la alteración permite establecer un programa de revisiones periódicas con la finalidad de detectar la aparición de la enfermedad en su estadio más inicial. Tal es el caso de los cánceres de colon en los casos familiares después de la detección de la mutación concreta responsable<sup>13,16</sup>.

trar el fármaco idóneo. Igualmente importante es el potencial de la utilización de *microarrays* para el estudio de la expresión génica en la identificación de dianas terapéuticas nuevas<sup>21</sup>. En este sentido, cabe decir que toda la farmacología actual se basa en tan sólo unas 400 dianas terapéuticas. Debido a que existe evidencia que el genoma humano consta de unos 35.000 genes, es previsible que en los próximos años se produzca un incremento del número de dianas terapéuticas disponibles en la investigación biomédica.

Otra línea en desarrollo encaminada al tratamiento de las enfermedades con base génica es la terapia génica<sup>22</sup>. Las aplicaciones potenciales son muy diversas. Por ejemplo, es posible introducir un gen normal con el objetivo de suplir una función ausente en una enfermedad recesiva tal como la fibrosis quística. Pero la terapia génica también puede ser útil a través de bloquear la expresión de un oncogén sobreexpresado en un cáncer. A parte de estos dos extremos, en cuanto a la estrategia terapéutica, existen otras muchas posibilidades. Todas estas estrategias terapéuticas en desarrollo, conjuntamente con la previsión de descubrir las causas y factores de riesgo asociados a las enfermedades con base génica, hacen prever una revolución en la forma de hacer la medicina sin precedentes.

Se prevé que el chip de ADN puede resultar muy útil en la detección de variación de los genes responsables del metabolismo y respuesta diferencial de los distintos individuos a un mismo fármaco (farmacogenómica).