



Genoma España
Salud humana

Genoma y Medicina



Genoma y Medicina



Genoma España
Salud humana

El presente informe ha sido realizado en el marco del convenio de colaboración conjunta entre Genoma España y la Fundación Gaspar Casal.

La reproducción parcial de este informe está autorizada bajo la premisa de incluir referencia al mismo, indicando: Genoma y Medicina. GENOMA ESPAÑA.

Genoma España no se hace responsable del uso que se realice de la información contenida en esta publicación. Las opiniones que aparecen en este informe, corresponden a los expertos consultados y a los autores del mismo.

© Copyright: Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica.

Autores:

D. Juan del Llano Señarís
D. José Luis Jorcano Noval
D. Jesús Millán Núñez-Cortés
D. Joaquín Arenas Barbero
D. Rubén Moreno Palanques
D.ª Beatriz Tabarés Rodríguez
D. Jesús Frías Iniesta
D. Enrique Castellón Leal
D.ª Milagros González Rivera
D. Jesús Francisco Bermejo Martín
D.ª M.ª Ángeles Muñoz-Fernández
D. Mariano Esteban Rodríguez
D. Ángel Zaballos Sanz
D. Juan Pablo Albar Ramírez
D. Alfonso Valencia Herrera
D. Julián Ruiz Ferrán
D. Jordi M. Gol Freixa
D. José Luis de Sancho Martín

Coordinador:

D. Juan del Llano Señarís (Fundación Gaspar Casal)

Coordinador:

D. César Ullastres García (Genoma España)

Edición y Diseño:

Silvia Enríquez (Genoma España)

Referencia: GEN-ES004005

Fecha: Noviembre 2004

Depósito Legal:

ISBN: 84-609-3002-5

Realización: Spainfo, S.A.



Índice de contenido

PRÓLOGO	7
1. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	9
2. CAPÍTULO II: IMPACTO DEL CONOCIMIENTO GENÉTICO EN LA CLÍNICA	17
3. CAPÍTULO III: EL DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS EN LA ERA POSTGENÓMICA	37
4. CAPÍTULO IV: FARMACOGENÉTICA: HACIA UNA TERAPIA PERSONALIZADA MÁS SEGURA Y EFICIENTE	55
5. CAPÍTULO V: DESDE LA ENFERMEDAD: UNA VISIÓN DE LA TECNOLOGÍA Y LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL	81
6. CAPÍTULO VI: CONCEPTOS Y FUTURAS APLICACIONES DE LA GENÓMICA, PROTEÓMICA Y BIOINFORMÁTICA EN EL CAMPO DE LA SALUD	97
7. CAPÍTULO VII: TESTS GENÉTICOS: IMPLICACIONES ÉTICAS Y JURÍDICAS	129
8. CAPÍTULO VIII: COSTES Y BENEFICIOS DE LAS BIOTECNOLOGÍAS APLICADAS A LA SALUD HUMANA	147
9. CAPÍTULO IX: LA TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA EN ESPAÑA Y SUS PROBLEMAS	161

Prólogo a la monografía:

“GENOMA Y MEDICINA” de Genoma España

La publicación, en abril de 2003, de la secuencia del genoma humano ha estimulado enormemente la investigación sobre las aplicaciones médicas de la genómica. Sin embargo, es a partir de ahora cuando se debe poner el énfasis en conocer las diferencias entre nuestros genomas individuales y estudiar porqué esas diferencias nos hacen distintos, no sólo en términos de apariencia física, sino en relación a nuestro riesgo de padecer enfermedades o en la respuesta que presentamos tras la administración de un medicamento. La comunidad científica está adentrándose en aspectos relacionados con las variaciones de los genes, su estructura y función y se profundizará en el estudio de los intrincados mecanismos moleculares que determinan el desarrollo de las enfermedades complejas. La genómica, al ser aplicada en medicina, ofrece la posibilidad de avanzar en una medicina más personalizada, que haga un uso eficiente del conocimiento de las diferencias genéticas individuales, de las causas moleculares de las enfermedades y de la influencia de factores ambientales en el desarrollo de las mismas.

Este potencial se concreta en oportunidades para llevar a cabo un mejor diagnóstico, incluso presintomático, desarrollar terapias más seguras y eficientes adaptadas a grupos de población con características genéticas diferenciadas, reclasificar algunas enfermedades atendiendo a sus causas moleculares y posibilitar nuevos enfoques para la epidemiología y salud pública.

Sin embargo una serie de aspectos han de ser resueltos antes de que la medicina genómica forme parte de los procedimientos clínicos de rutina. Sin voluntad de exhaustividad, se necesita incrementar la formación de pacientes y profesionales de la salud en estas materias, garantizar la equidad (tanto social como geográfica) en el acceso a estas tecnologías, definir sistemas de acreditación de laboratorios y garantía de calidad de los tests genéticos, garantizar la protección de los datos personales y desarrollar legislación que evite la discriminación por razones genéticas.

El presente trabajo enriquece el ámbito de las publicaciones en castellano sobre las implicaciones de la investigación genómica en Medicina y puede contribuir a abordar algunas de las cuestiones planteadas. El texto realiza un recorrido, a través de nueve capítulos firmados por diferentes expertos, desde las bases teóricas de la genómica, hasta los aspectos éticos legales, sociales y económicos de las aplicaciones de esta disciplina en Medicina, pasando por los aspectos tecnológicos básicos (bioinformática, genómica y proteómica) y las nuevas aproximaciones experimentales (farmacogenética y farmacogenómica, caracterización molecular de las enfermedades).

Hay que destacar que los coordinadores han conseguido reunir un plantel de autores de reconocido prestigio en muy diversas disciplinas (investigación, práctica clínica, tecnología, servicios de salud, industria), como exige un tratamiento riguroso de un área, la medicina basada en la genómica, cuyas fronteras no están todavía claramente trazadas.

Por todo ello, animamos a los profesionales sanitarios a los que este libro está dirigido, a adentrarse entre sus páginas para incrementar y actualizar sus conocimientos en una de las nuevas fronteras de la moderna medicina.

Francisco Gracia Navarro

Director del Instituto de Salud Carlos III

Capítulo I:

Introducción

Autores:

Juan del Llano Señarís

- Doctor en Medicina, Universidad Complutense de Madrid. Especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública. M.Sc. Community Health, Usher Institute, University of Edinburgh. Director General de la Fundación Gaspar y Casal. Presidente de la Asociación Española de Evaluación de Tecnologías Sanitarias.

José Luis Jorcano Noval

- Doctor Ciencias Físicas, Universidad Complutense de Madrid. Responsable de Programa "Daño, Reparación e Ingeniería Tisular en Epitelios del Ciemat". Director General de la Fundación Genoma España.



Introducción

La publicación hace aproximadamente 50 años, de la estructura de la molécula del ADN, por Watson y Crick, supuso un hito en la historia del conocimiento y marcó el inicio de un proceso, cada vez más acelerado, de descubrimientos en los campos de la Biología y la Medicina. En estos años en los laboratorios de Biología Molecular y Celular se aprendió a identificar, aislar y manejar los genes que contienen la información para las más variadas estructuras y funciones celulares y, en última instancia, para la formación de un ser vivo y su complejo funcionamiento.

También se hicieron significativos avances en asociar alteraciones de genes con el desarrollo de enfermedades, es decir, en la comprensión de las bases moleculares de las enfermedades. En este aspecto, ha resultado de gran importancia la posibilidad de generar animales transgénicos, en general ratones, en los que bien se induce o se reprime la actividad (expresión) de un gen predeterminado, o se introducen en sus genes alteraciones (mutaciones) definidas, en general sospechosas de estar asociadas a patologías. Aunque con la limitación que representa la diferencia de especies, estos animales son con frecuencia excelentes modelos donde investigar las causas moleculares de las enfermedades humanas, así como identificar nuevos blancos y ensayar nuevas estrategias terapéuticas.

A lo largo de los años 2001 a 2003 fueron haciéndose públicas sucesivas versiones, cada vez más completas, de la secuencia del genoma humano, sin duda otro hito del conocimiento humano. Desde entonces, ha sido publicada la secuencia de varios animales superiores (ratón, rata, la del chimpancé está a punto de ser publicada, etc.) y es conocida la de numerosos organismos inferiores entre ellos importantes organismos modelos experimentales, tales como la mosca *D. melanogaster* y el gusano nematodo *C. elegans*, y la de un alto número de microorganismos patógenos.

Estos estudios nos han permitido estimar cuántos genes tenemos (aproximadamente 30.000, un número bastante inferior al por muchos esperado) y su posición en los cromosomas. También hemos aprendido que el genoma de dos humanos se diferencia en un 1 por 1000 de sus bases (es decir los cuatro nucleótidos representados por las letras A, T, G, C), lo que implica unos 3 millones de variaciones, parte de las cuales están relacionadas con nuestras diferencias interindividuales, otra parte son silenciosas (no tienen efectos fenotípicos) y otras, quizás las más interesantes para la presente publicación, están asociadas a las enfermedades que padecemos o a nuestra disposición o resistencia a contraerlas. También hemos recibido algunas lecciones de humildad. Por ejemplo, que nuestro genoma se diferencia tan sólo un 1,2% del de los chimpancés y que el 99% de los genes de ratón tienen homólogos en humano.

Sin duda, la secuenciación del genoma humano es un gran logro que facilitará enormemente el desarrollo de la Biomedicina. Sin embargo, lo más difícil queda aún por hacer: encontrar la función de estos genes, lo que se conoce como genómica funcional, su asociación con las enfermedades y cómo podemos utilizarlos para prevenir o curar éstas. Estos son los objetivos de la llamada "era post-genómica" y, aunque sabemos que alcanzarlos costará mucho más tiempo y esfuerzo de lo que costó secuenciar nuestro genoma, existen pocas dudas de que se acercan grandes cambios y nuevas posibilidades en el pronóstico, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades, así como en la generación de medicamentos más eficaces y con menores efectos secundarios. Por todo ello, se empieza a decir que estamos saliendo de una era en la que se habla un idioma de dos "letras" (el 0 y el 1 del lenguaje digital de los ordenadores) y entrando en otra en la que aquellos países que quieran prosperar deberán hablar un nuevo idioma de cuatro "letras" (los cuatro nucleótidos A, T, G, C del ADN).

Estos cambios serán posibles porque al amparo del Proyecto Genoma Humano se están desarrollando una serie de tecnologías, denominadas de alto rendimiento, que por primera vez nos permiten analizar el comportamiento de todos los genes (técnicas genómicas), proteínas (técnicas proteómicas) o metabolitos (técnicas metabolómicas) de una célula o tejido en respuesta a una enfermedad o un tratamiento. La ingente cantidad de datos que el uso de estas tecnologías está generando, lo que constituye el proceso de acumulación de información más rápido de toda la historia de la Humanidad (terabytes), ha requerido el desarrollo de una nueva disciplina, la bioinformática, para ser capaces de almacenarlos y explotarlos adecuadamente. Con el desarrollo de la bioinformática se espera llegar a tener la posibilidad de hacer predicciones "in silico" acerca de aspectos tan

relevantes para la industria farmacéutica como la estructura tridimensional de las proteínas y sus interacciones con pequeñas moléculas (potenciales medicamentos) que regulen su actividad. O la integración de los datos del genoma de los pacientes, con sus historiales clínicos y los resultados de los laboratorios de investigación, para acelerar nuestro conocimiento de, por ejemplo, las causas moleculares de las enfermedades o la respuesta individual a los fármacos.

Aunque la secuenciación por primera vez del genoma humano requirió un esfuerzo de varios años, millones de dólares y un alto número de laboratorios de todo el mundo, en el momento presente existen métodos, llamados de genotipación, que permiten analizar, de una manera progresivamente más rápida y barata, las diferencias que existen entre los genomas de los individuos. Por otra parte, se espera que, para el año 2010, existan métodos que permitan secuenciar el genoma de una persona en tiempo real (unas horas) y a un precio económicamente asumible (1.000 – 10.000\$). Esto permitirá que, al poder comparar los genomas de poblaciones, podamos avanzar mucho más rápidamente en el conocimiento de las causas genéticas de las enfermedades, en particular de las enfermedades más prevalentes (cáncer, cardiovasculares, neurodegenerativas, etc.) que son complejas, ya que dependen de múltiples genes y de la interacción con el medio ambiente, así como de la respuesta individual a los tratamientos. Esto permitirá predecir la sensibilidad de una persona a padecer enfermedades en número creciente de ocasiones y de su respuesta a los medicamentos y constituye la base de poder pensar en el futuro en una “medicina personalizada”.

Por otra parte, los microarrays o chips de ADN, las técnicas proteómicas y las metabolómicas están mejorando sensiblemente nuestras capacidades diagnósticas y pronósticas. En los microarrays, secuencias del ADN que en su conjunto representan varias veces todos los genes del genoma, se depositan de una manera ordenada en un vidrio especial de unos pocos cm². Esta técnica permite analizar el comportamiento, es decir, la inducción o represión, de todos los genes que se expresan en un tejido, como consecuencia de, por ejemplo, una enfermedad o un tratamiento. A partir de ello, se puede determinar un número mucho más reducido de genes, típicamente 20-100, denominados “firma genética”, que permite clasificar las enfermedades y predecir su evolución (por ejemplo, tiempo libre de enfermedad tras un tratamiento o tiempo libre de metástasis) de una manera más precisa que los métodos hasta ahora utilizados. En el momento presente, están empezando a ser comercializados chips para el diagnóstico de linfomas y cánceres de mama, y están en fase experimental otros relacionados con cáncer de próstata, vejiga y colon, y con enfermedades neurodegenerativas. También son comerciales chips para la hipercolesterolemia o para medir el efecto tóxico de fármacos. Por otra parte, siguiendo el mismo concepto que con el ADN, se están desarrollando microarrays de proteínas, anticuerpos, tejidos...

De una manera similar a la utilidad de la “huella genética” obtenida a partir de los chips de ADN, a través de las técnicas proteómicas y metabolómicas, se están determinando conjuntos de un número reducido de proteínas o metabolitos, cuyos patrones de alta o baja expresión sean de utilidad diagnóstica y/o pronóstica. Se está poniendo especial interés en desarrollar estas técnicas utilizando suero de los pacientes. Por otra parte, la capacidad de medir parámetros en suero (proteínas o metabolitos, respectivamente) es de varios miles por muestra ya en el momento presente, es decir, muy superior a los métodos más sofisticados de que ahora disponemos.

Finalmente, desde el punto de vista de tratamiento es evidente que el uso de la ingeniería tisular, la terapia génica o las células madre (adultas o embrionarias, utilizadas directamente o previa diferenciación hacia tipos celulares predeterminados) ofrecen nuevas alternativas para la recuperación o regeneración de tejidos dañados (por ejemplo, el tratamiento de quemaduras extensas, el daño óseo o de cartílagos, de la diabetes tipo I, del infarto de miocardio o de las enfermedades neurodegenerativas) o el tratamiento de enfermedades prevalentes (cáncer, cardiovasculares, diabetes tipo II, etc.). Aun en el caso de que estas promesas no lleguen a plasmarse en su totalidad o que cueste un esfuerzo y unos plazos temporales mayores de los inicialmente estimados, existen pocas dudas de que, en un futuro cercano, asistiremos a profundos cambios en los métodos de prevenir, diagnosticar y curar las enfermedades.

En el nuevo paradigma de la medicina molecular, una enfermedad viene definida por una matriz de genes alterados. Esto permitirá a la industria farmacéutica crear una nueva generación de medicamentos, fármacos diseñados racionalmente para modular la función de esos genes que están alterados en cada patología. La importancia de este



fenómeno es incalculable. La industria farmacéutica mundial mueve 350.000 millones de € anuales, una cifra similar al sector del automóvil. Pero a diferencia de dicho sector, son las arcas públicas las que costean buena parte de los medicamentos. La Genómica quizá pueda reducir los costes actuales, ya que podrá predecir quién se puede beneficiar de un medicamento y evitar su administración a quién sólo le provoque efectos secundarios indeseables. Permite identificar los genes responsables de las diferentes respuestas al tratamiento, y diseñar nuevos fármacos para personas que no respondan ahora. El estudio del genoma, predecirá también la susceptibilidad del individuo a una determinada enfermedad. Y se podrán detectar los genes alterados antes de que se produzca la misma.

Las promesas de la genómica son muchas y en general se enfatizan las positivas. Por otra parte, las posibilidades de comprender las causas biológicas del comportamiento humano han aumentado y también las capacidades de posibles manipulaciones. El problema de cómo regular la producción y difusión de estas nuevas tecnologías es de envergadura. Otro tema, en absoluto baladí es el que ocupa a la llamada personalización de la medicina. En su práctica esperemos que los tratamientos más individualizados puedan reservarse a un número reducido de pacientes que no respondan satisfactoriamente a los tratamientos generales. Los problemas de una medicina atomizada pueden compensarse por los beneficios de la especialización médica y por las mejoras de los sistemas de información que faciliten una atención en tiempo real y con todos los datos clínicos del paciente. Una mejor educación y capacitación del paciente en el manejo de sus problemas clínicos mejoraría con la integración de la información sobre el manejo de dichos problemas por parte del propio paciente. La formación de los médicos debería ser más integradora. Estamos a tiempo de minimizar la paradoja de la terapia individual: muy apreciada por los individuos y muy poco coste-efectiva desde el punto de vista social. Las políticas de salud, vía regulación, pueden incentivar estrategias más eficientes de actuación sobre las enfermedades.

Todo lo relativo al genoma está inmerso, por tanto, en un intenso debate social, ecológico, político, etc. Este debate, a nuestro entender no incluye apropiadamente a los profesionales de la salud en lo que debería ser la asimilación y difusión de conocimientos que proporcionen una opinión fundada y unas expectativas comedidas. Precisamente éste es el objetivo de la publicación que tienen en sus manos: difundir y acercar los conocimientos básicos de estas nuevas tecnologías que sean útiles para los profesionales de la medicina y, en particular, para los médicos que trabajan en centros hospitalarios.

La necesidad del presente libro surgió tras el Informe realizado por Genoma España, en colaboración con el OPTI (Observatorio de Prospectiva Tecnológica Industrial) sobre el Impacto de la Biotecnología en el Sector Sanitario: Primer informe de prospectiva tecnológica, cuyo objetivo era identificar y valorar las tendencias de investigación y desarrollo tecnológico en biomedicina, y así conocer el futuro en el sector y establecer 'medidas' que incidan en el óptimo desarrollo. En este estudio, se partió de un exhaustivo estudio de documentos internacionales, a partir de los cuales se seleccionaron 30 tecnologías, cuya relevancia para nuestro país fue analizado en el panel de 12 expertos que las redujo a 16 tecnologías críticas. Las conclusiones del documento se basan en las opiniones de este panel y en las respuestas de 111 investigadores y expertos, tanto de centros públicos como privados, a un cuestionario que intentaba valorar el grado de importancia de las tecnologías seleccionadas como críticas, así como estimar su fecha de implantación y la posición competitiva de España respecto a ellas. El 55% de los expertos de hospitales evaluaron como bajo su conocimiento sobre las tecnologías encuestadas. Este porcentaje es significativamente mayor que el del resto de profesionales consultados e indica un déficit de conocimiento por parte de los médicos clínicos de nuestro país en las biotecnologías encuestadas.

Las tecnologías explicitadas por los expertos encuestados con mayor grado de importancia son:

**TECNOLOGÍAS
CON MAYOR GRADO
DE IMPORTANCIA**

- ❖ TERAPIAS DE CÉLULAS PLURIPOTENCIALES.
- ❖ AUTOMATIZACIÓN EN LA SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.
- ❖ MICROARRAYS DE ADN BIOCHIP PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y CLÍNICO.
- ❖ ANÁLISIS DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA O LIBRERÍA COMBINATORIA.
- ❖ ULTRA-SECUENCIACIÓN GENÓMICA.
- ❖ FARMACOGENÉTICA.
- ❖ PREDICCIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE ESTRUCTURA TERCIARIA DE PROTEÍNAS.
- ❖ ALTO RENDIMIENTO EN PRODUCCIÓN DE MODELOS ANIMALES TRANSGÉNICOS.

Las áreas de mayor impacto en Biotecnología en el sector de la salud, son las denominadas tendencias tecnológicas, y se han estructurado en cuatro grupos, atendiendo a su objetivo final:

- DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y PRONÓSTICO DE ENFERMEDADES.
- DESARROLLO DE FÁRMACOS.
- TERAPIA CELULAR E INGENIERÍA GENÉTICA DE TEJIDOS.
- TERAPIA GÉNICA Y VACUNAS GÉNICAS.



La investigación y desarrollo en estas áreas supondrá uno de los grandes retos de nuestra era.

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR
Y PRONÓSTICO
DE ENFERMEDADES**

La inclusión de parámetros genéticos y moleculares en el análisis clínico nos llevará a diagnósticos más concretos, terapias más efectivas y con menores efectos secundarios e incluso a conocer los riesgos de padecer ciertas patologías.

**DESARROLLO
DE FÁRMACOS**

El desarrollo de herramientas de validación de las dianas terapéuticas, sobre las que se ensayan compuestos candidatos a fármacos, es una de las metas de la industria farmacéutica. Estas herramientas permitirán una importante reducción de costes asociados al descubrimiento de fármacos.

**TERAPIA CELULAR
E INGENIERÍA GENÉTICA
DE TEJIDOS**

El avance en el conocimiento molecular y celular permitirá que en los próximos años algunos tratamientos con medicamentos sean sustituidos por terapias celulares, ya sean del propio paciente o de un donante, o incluso la reconstrucción o regeneración completa de tejidos y órganos. El desarrollo de tecnologías capaces de producir estas terapias tendrá un importante valor añadido en el futuro.

**TERAPIA GÉNICA
Y VACUNAS GÉNICAS**

La corrección de defectos génicos o la lucha contra enfermedades mediante inserción o expresión de genes en el paciente es una prometedora vía para solucionar enfermedades congénitas o patologías adquiridas. Es importante destacar que el futuro desarrollo de vacunas génicas permitirá una expresión más estable y dirigida del anticuerpo en el individuo a inmunizar.

Los temas abordados en el libro son de interés para profundizar en el conocimiento de lo que la Genómica y Proteómica pueden aportar a la práctica de la medicina.

En el capítulo 1, *Juan del Llano y José Luis Jorcano* hacen una introducción al texto que muestra la interacción entre medicina y genómica, apuntan las razones que les llevaron a su elaboración, y presentan lo sustantivo de cada capítulo.

Jesús Millán y Joaquín Arenas, en el capítulo 2, nos acercan a las aplicaciones clínicas que ya tienen las nuevas tecnologías sobre Genómica y Proteómica. El gran progreso en el estudio (diagnóstico y tratamiento) de poblaciones o individuos con riesgo de padecer enfermedades tiene su base, generalmente, en el estudio de los genes que se expresan y en el estudio de los polimorfismos debido a que ambas cosas son las que tienen auténtica trascendencia funcional. La expresión de los genes (más que la propia dotación génica) y los polimorfismos existentes en ellos es lo que explica y condiciona las diferencias de los individuos en términos de susceptibilidad a las enfermedades o de respuesta a los tratamientos.

En el capítulo 3, *Jesús Frías y Beatriz Tabares* nos auguran que gracias a los avances de la Genómica y Proteómica llegaremos, posiblemente no en el tiempo inicialmente previsto y con dificultades de todo tipo, al desarrollo y utilización de fármacos más seguros y eficientes, y a la creación de terapias a la carta. La farmacogenética continúa siendo una disciplina médica joven. Muchos aspectos teóricos y prácticos siguen requiriendo su clarificación antes de que se alcance su completo desarrollo y máximo beneficio. Sin embargo, durante los últimos años se han producido avances sin precedentes en nuestro conocimiento sobre la importancia del polimorfismo genético en la determinación de la susceptibilidad personal a desarrollar diversas enfermedades y en el grado de eficacia y tolerancia de los medicamentos utilizados en diversas áreas terapéuticas. Aunque existen algunas sombras en el camino, la práctica de la farmacogenética es un reto para la industria farmacéutica, las autoridades reguladoras, la comunidad médica, los pacientes y la sociedad como un conjunto, con nuevas preguntas y temas. Se espera que la farmacogenética tenga un amplio impacto no sólo sobre el desarrollo de fármacos y el proceso regulatorio de aprobación para su uso, sino también sobre cómo se prescriben y administran los medicamentos a los pacientes, y existen, por qué no decirlo, consideraciones éticas que afectan a pacientes, médicos y sociedad que deberán estudiarse con detenimiento a medida que los conocimientos farmacogenéticos y sus consecuencias vayan cambiando los hábitos médicos.

Rubén Moreno, en el capítulo 4, nos acerca a la importancia de la Genómica y Proteómica en el desarrollo de los nuevos fármacos. Los descubrimientos en investigación básica dinamizados por el Proyecto Genoma Humano están revolucionando la capacidad para determinar las bases moleculares de las enfermedades. Sin embargo, en muchos casos, estas bases son enormemente complejas y el resultado de la interacción de numerosas proteínas y factores biológicos. Las nuevas tecnologías que nos pueden ayudar en el manejo de tan vasta información, están teniendo un gran impacto en cada una de las fases del desarrollo de fármacos. Esto incluye la influencia de la genómica y de la genómica funcional en la identificación y validación de dianas moleculares, cribado de alto rendimiento para el descubrimiento de "hits", diseño de fármacos basado en estructura y química combinatoria para la optimización de compuestos cabeza de serie, y estrategias nuevas "in vivo" e "in vitro" para acelerar la optimización final y el análisis preclínico de los fármacos candidatos. Todas estas tecnologías ya han permitido una revolución en el tratamiento del SIDA, y serán la base de la próxima generación de nuevos medicamentos para grandes problemas de la humanidad como cáncer, diabetes, o enfermedades neurodegenerativas, de una forma eficaz y eficiente en el futuro más inmediato.

Enrique Castellón, Milagros González, Jesús Francisco Bermejo y Ma Ángeles Muñoz, en el capítulo 5, nos presentan una panorámica desde la enfermedad del interfaz entre la tecnología y la investigación clínica experimental. Los próximos años nos traerán sin duda grandes avances en la investigación de las células pluripotenciales a nivel molecular. Ello permitirá identificar los genes implicados en la autorenovación, perpetuación y diferenciación. De modo análogo, los genes implicados en la reprogramación celular de células adultas serán identificados para poder convertirse en otro tipo celular. Las posibilidades son muchas, pero habrá que decantarse por las que sean más factibles de ser aplicadas en los pacientes, todo sobre un fondo de debate ético según el cual habrá que valorar la balanza riesgo-beneficio de su aplicación.

Mariano Esteban, Angel Zaballos, Juan Albar y Alfonso Valencia, en el capítulo 6, apuntan las futuras aplicaciones de la Genómica, Proteómica y Bioinformática en el campo de la salud, desde la óptica de la investigación básica. Los avances espectaculares de los métodos bioinformáticos junto con las tecnologías genómica y proteómica, han puesto de manifiesto que es posible abordar el complejo funcionamiento de nuestros genes y sus consecuencias para el crecimiento normal o anormal de las células que componen los tejidos de un organismo. La pregunta de si la secuenciación completa del genoma humano supone que vamos a conocer rápidamente cómo funcionan nuestros genes, debido a su limitado número (con anterioridad a la secuenciación del genoma se estimaron unos 100.000 genes, luego después de la secuenciación este número se redujo a 40.000 genes y actualmente después del refinamiento de la secuencia dicho número se considera que está entre 20.000 y 30.000 genes), parece que no es tan fácil de responder y va a llevar muchos años elucidar la funcionalidad de todos nuestros genes. El genoma contiene toda la información pero leerlo no basta para decodificarla.

Julián Ruiz, en el capítulo 7, relata las implicaciones que de todo tipo traerán estas nuevas tecnologías empleadas como pruebas genéticas. El debate científico, jurídico y ético en torno a dichas pruebas no ha hecho más que empezar, y alcanzará su punto álgido a lo largo de la segunda década de este siglo cuando los avances en genómica, hagan posible el despistaje genético de muchas enfermedades frecuentes y de gran impacto en la morbimortalidad de la población de forma rápida, fiable y coste-efectivo.

José Luis de Sancho y Jordi Gol, en el capítulo 8, nos informan de los costes y beneficios potenciales de las tecnologías de la genómica y proteómica en el sector sanitario. Comentan los aspectos clave de su priorización y financiación públicas. El grado de desarrollo de estas tecnologías y su aplicabilidad es materia que preocupa a los entes financiadores y ciertamente a las autoridades responsables, quienes revisan el estado de la situación de forma dinámica y la actualizan. En el caso de España destacan al Observatorio de Prospectiva Tecnológica Industrial, del Ministerio de Ciencia y Tecnología, y a la Fundación Genoma España. Estos organismos han identificado una serie de tecnologías, clasificando a algunas de ellas como críticas, desde el punto de vista de su impacto estratégico para el desarrollo científico español.

Enrique Castellón, en el capítulo 9, nos habla finalmente de la transferencia de las tecnologías en España y su problemática. Nos ayuda a reflexionar sobre preguntas tales como: ¿por qué no aparecen más empresas biotecnológicas en el campo de la salud humana y por qué las que aparecen tienen grandes dificultades en prosperar?, y ¿por qué razón la investigación translacional es quizá el punto más débil de la I+D+i española?





Capítulo II:

Impacto del conocimiento genético en la clínica

Autores:

Jesús Millán Núñez-Cortés

- Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad Complutense de Madrid. Especialista en Medicina Interna y Oncología Médica. Catedrático de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid y Hospital Universitario Gregorio Marañón.

Joaquín Arenas Barbero

- Jefe de Servicio de Investigación, Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Consejería de Sanidad y Consumo, Comunidad de Madrid.

Impacto del conocimiento genético en la clínica

Los dos meses que van desde el 28 de febrero de 1953, fecha en la que se oye la frase "Hemos encontrado el secreto de la vida" en el pub "The Eagle" en Cambridge, y el 25 de abril, fecha en la que James Watson y Francis Crick publican en "Nature" la propuesta de estructura de doble hélice del ADN con un enfrentamiento espacial constante entre las bases adenina-timina y guanina-citosina pueden ser considerados los pilares de la obra arquitectónica que se ha levantado en genética molecular.

El nivel de conocimiento biomédico actual, y su potencial contribución a la salud del ser humano, nunca había alcanzado cotas tan elevadas (1). El punto de partida de la biomedicina en el siglo XXI es el acceso a la secuencia completa del genoma humano. El objetivo de la medicina se traslada ahora a cuestiones como estructura, funciones e interacciones de genes y proteínas, y al estudio de las vías fisiológicas y sistemas biológicos como causas de aplicación médica de los conocimientos estructurados mencionados. La genética, la bioquímica y la biología estructural están acelerando así el proceso de investigación hacia un control más racional de las enfermedades humanas.

Para la moderna medicina clínica, la aportación de la genómica y proteómica está resultando crítica a la hora de entender mejor las situaciones fisiopatológicas, en la mayor disponibilidad de métodos de diagnóstico más precoces y precisos, y en el desarrollo de nuevos fármacos y estrategias terapéuticas (2).

El principal objetivo de estas disciplinas es el entendimiento integrado del funcionamiento de las células y los organismos, estudiando las numerosas interacciones entre genes y proteínas para generar un todo funcional, y sus posibles alteraciones en circunstancias patológicas, para poder así diseñar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas.

○ Bases de la enfermedad molecular

El genoma humano (3, 4) es una secuencia de unos tres mil millones de nucleótidos presentes en el ADN. El genoma es el conjunto de genes de un organismo. Un gen es un segmento de la secuencia de ADN que codifica un producto (habitualmente una proteína) de función bien definida y que se encuentra localizado en un cromosoma concreto. Los ácidos nucleicos son las moléculas constitutivas del ADN y del ARN. La molécula de ácidos nucleicos condiciona la síntesis de proteínas; es, sencillamente, su precursor natural imprescindible.

1. ADN

El ADN (ácido desoxirribonucleico) está constituido por tres elementos químicos: un azúcar de 5 átomos de carbono (desoxirribosa), un fosfato, y una base nitrogenada, que puede ser púrica (adenina o guanina) o pirimidínica (citosina o timina). La unión del azúcar (pentosa) con la base nitrogenada constituye el nucleósido; y de éste con el grupo fosfato, el nucleótido. Así, las cadenas de ácidos nucleicos están formadas por la unión de numerosos nucleótidos.

El ADN está formado por dos cadenas de nucleótidos, unidas estructuralmente de una forma estable gracias a que se mantiene la distancia de los enlaces entre las dos cadenas. Ambas cadenas llevan un sentido opuesto, por lo que una de ellas se conoce como complementaria de la otra. La disposición espacial de la doble cadena es la de doble hélice, de tal forma que las bases nitrogenadas se disponen hacia el interior de la estructura, mientras que las pentosas y fosfatos se disponen hacia el exterior. Los enlaces se establecen, por tanto, entre las bases nitrogenadas de tal forma que en el ADN la complementariedad viene determinada por enlaces entre adenina y timina (A-T) o entre guanina y citosina (G-C).

2. ARN

La estructura básica del ARN (ácido ribonucleico) es similar, salvo que en lugar de timina contiene uracilo, y que la pentosa contiene un grupo OH en el carbono 2, siendo así una ribosa. Además, el ARN está constituido por un solo filamento o cadena de nucleótidos, formados –a su vez– por nucleósidos (ribosa + base nitrogenada) y el grupo fosfato.

El ARN puede ser: mensajero (ARNm), ribosómico (ARNr) y de transferencia (ARNt). Aún teniendo la misma composición, sus funciones son bien diferentes, tal y como se esquematizará a continuación.

3. Duplicación, transcripción de señal, y síntesis de proteínas

Los ácidos nucleicos tienen las propiedades de duplicarse (replicación), transcribirse (transcripción) y sintetizar proteínas (traslación).

DUPLICACIÓN

El proceso de duplicación permite copiar exactamente las dos cadenas de ADN. Con este objetivo, el primer paso es el desenrollamiento (o estiramiento) de la doble hélice, y la separación de las dos cadenas gracias a la acción del enzima helicasa. Posteriormente se producirá la síntesis de nuevas cadenas de ADN acopladas a cada una de las cadenas anteriores, gracias a la acción del enzima ADN-polimerasa.



No toda la cadena de ADN contiene información útil desde el punto de vista genético. En efecto, la secuencia de nucleótidos en el ADN es tal que se alternan zonas o secuencias que sí que son capaces de codificar proteínas (exones) con otras que –situadas entre los exones– no codifican proteínas (intrones). El número de exones e intrones en cada cadena de ADN es muy variable.

Un gen no es más que una parte de la cadena de ADN constituida por una secuencia de exones e intrones, en número variable, y que es capaz de codificar la síntesis de una proteína concreta. Cada gen, por tanto, tiene una dimensión y una composición variable en función de su propia secuencia de exones e intrones. La parte más próxima al primer exon del gen, rica en guanina y citosina, es conocida como el promotor del gen debido a que será capaz de iniciar la transcripción una vez que se una a un complejo enzimático activador. Si las citosinas de la zona del promotor del gen se encuentran metiladas (incorporación de grupos metilos CH₃) el complejo enzimático activador no podría actuar y, por tanto, no se podría iniciar la transcripción de la información genética.

TRANSCRIPCIÓN

Sobre la cadena de ADN duplicada se formará una cadena de ARNm a través de la síntesis de nucleótidos complementarios. La cadena de ADN servirá de molde para la síntesis de la de ARNm. La reacción es catalizada por el enzima ARN-polimerasa. Como ya queda señalado, en la cadena de ARNm se sitúa el uracilo en lugar de la timina.

La cadena de ARNm así formada (ARNm primario) se separa de su molde de ADN, y es metilada en el extremo 5' (fenómeno de "camping") y poliadenilada en el extremo 3' (polyA). Estas modificaciones le confieren protección frente a las nucleasas que pudieran llegar a degradar la cadena de ARNm formada, y favorecen el transporte del ARNm a los ribosomas citoplasmáticos. Además, tales cambios favorecen la pérdida de intrones (sin información genética útil) en el ARNm (fenómeno conocido como "splicing"), quedando así una molécula estable, que puede desplazarse desde el núcleo hasta los ribosomas del citoplasma celular (donde se sintetizarán las proteínas) y que contiene de forma cifrada toda la información para la síntesis de proteínas, que posteriormente será descifrada.

TRADUCCIÓN

Este es el fenómeno por el que se traducen las secuencias de nucleótidos del ARNm formado como se señala previamente al lenguaje operativo de síntesis de proteínas. Es decir, conduce al ensamblaje de los diferentes aminoácidos en cadena, característicos de cada una de las proteínas que se han de sintetizar.

Para que esto tenga lugar es preciso, no sólo el concurso del ARNm, sino también del ARNt (de transferencia) y del ARNr (ribosómico).

TRANSCRIPCIÓN DEL ARNm

❖ ARNm. Cada molécula o cadena de ARNm está compuesta de nucleótidos, tal y como queda señalado. Cada conjunto de tres nucleótidos, estructura que se conoce como codón, es capaz de codificar un aminoácido. En otras palabras, cada codón lleva la información sobre cuál es el aminoácido que codifica. De acuerdo, por tanto, con la secuencia de codones en la molécula del ARNm podrá descifrarse una determinada secuencia de aminoácidos hasta la síntesis completa de una proteína. El hecho fundamental sobre el que asienta este proceso es que hay una correspondencia entre el codón codificador (con las tres bases presentes en sus tres nucleótidos) y un aminoácido determinado.

❖ ARNt. Los ARNt son las moléculas "adaptadoras" que portan los aminoácidos hasta los ribosomas, donde se decodifica la información procedente del ARNm. Los ARNt están formados por secuencias de entre 60 y 95 nucleótidos que se pliegan formando "loops", uno de los cuales se denomina anticodón por tener una secuencia complementaria al codón.

❖ ARNr. El ARNr permite la unión entre el ARNm y el ARNt. Se encuentra constituido por una secuencia de nucleótidos y aminoácidos, que se configuran en dos unidades de distinto tamaño: una mayor (60S) y una menor (40S). En la primera existen tres espacios de unión al ARNt: zona peptídica, zona aminoacídica, y zona "exit".

Para una correcta traducción genética, la zona peptídica del ARNr se enfrenta al codón de iniciación del ARNm y a continuación se coloca el ARNt que es complementario. Como quiera que el ARNt porta el aminoácido concreto, el alineamiento progresivo entre las moléculas provoca, asimismo, el alineamiento progresivo entre los diferentes aminoácidos y éstos quedan enlazados mediante uniones peptídicas.

El fenómeno está facilitado por un movimiento sucesivo del ribosoma sobre el ARNm lo que implica que las moléculas de ARNt vayan siendo desplazadas por otras, también de ARNt, con nuevos y distintos aminoácidos. Así se irá formando la cadena de aminoácidos enlazados hasta la síntesis completa de la proteína. El proceso se interrumpe gracias a la aparición de un codón que no codifica ningún aminoácido (codón de paro), significando que la proteína se ha formado completamente y puede ser liberada al citoplasma.

4. Lesiones del material genético

Se conoce como "lesión del ADN" ("DNA damage") las modificaciones que puede sufrir el ADN como consecuencia de mutaciones.

Ejemplo de estas circunstancias son las alteraciones en la composición molecular del ADN, como es el caso de la pérdida de bases púricas y/o pirimidínicas en la cadena de ADN, la deaminación de las bases púricas y/o pirimidínicas (pérdida del grupo amino en las bases), la posible dimerización de las bases lo que puede provocar una distorsión de la doble hélice, la modificación química de las bases por transferencia de grupos metilo e etilo lo que altera el fenómeno de la transcripción de la información genética; etc. Tales situaciones pueden surgir de manera espontánea o merced a la acción de factores ambientales de distinta naturaleza (por ejemplo, radiaciones ultravioleta, agentes alquilantes, etc).

Ante una "lesión del ADN", los posibles patrones de respuesta son tres:

- LA CÉLULA "REPARA" LA LESIÓN, PARA LO QUE DISPONE DE MECANISMOS PROPIOS ("DNA REPAIR").
- LA CÉLULA SE AUTODESTRUYE (APOPTOSIS) SI LA LESIÓN DEL ADN NO PUEDE SER REPARADA.
- LA LESIÓN EN EL MATERIAL GENÉTICO PERSISTE Y EL DAÑO SE TRANSMITE A TRAVÉS DE LA DUPLICACIÓN DEL ADN.

Por tanto, la respuesta a la lesión del ADN puede no tener consecuencias si se produjera una inversión de la lesión ("reversal od DNA damage"), un corte de la lesión ("excisión od DNA damage") o una tolerancia ("tolerance of DNA damage"). En caso contrario nos encontraríamos con una alteración del ADN permanente y transmisible, con las consecuencias lógicas que pudiera acarrear.

○ Medicina clínica y medicina molecular

Tradicionalmente, el proceso diagnóstico abarcaba tres partes: la anamnesis, la exploración clínica, y la realización de exploraciones complementarias. El conocimiento de las alteraciones moleculares que subyacen a las enfermedades puede permitir un gran avance al transformar lo que hasta ahora era conocida como "detección clínica" de la enfermedad en una "detección subclínica" (Cuadro 1). El gran objetivo ha sido, y lo es en este momento, alcanzar el diagnóstico en los estadios más precoces de la enfermedad y, si ello fuera posible, en una fase previa a la aparición de las alteraciones clínicas, las anomalías estructurales, o las modificaciones bioquímicas que caracterizan al cuadro clínico en los primeros momentos de su expresividad.

La detección de anomalías genéticas (5) características de una enfermedad puede afectar a tres niveles (Cuadro 2):

- ALTERACIONES EN EL ADN (MODIFICACIONES DEL GENOMA).
- ALTERACIONES EN LA TRANSCRIPCIÓN DEL ARNM (MODIFICACIONES DEL TRANSCRIPTOMA).
- ALTERACIONES EN LA CONSTITUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS (MODIFICACIONES DEL PROTEOMA).

Estos tres niveles reflejan las tres fases constitutivas de la forma en la que se manifiesta la carga genética del individuo:

- SITUACIONES CLÍNICAS/ENFERMEDADES QUE SE ACOMPAÑAN DE ALTERACIONES EN EL MATERIAL GENÉTICO.
- SITUACIONES CLÍNICAS/ENFERMEDADES QUE SE ACOMPAÑAN DE ALTERACIONES EN LA TRANSCRIPCIÓN Y REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE LOS PRODUCTOS.
- SITUACIONES CLÍNICAS/ENFERMEDADES QUE SE ACOMPAÑAN DE ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN PROTEICA DE LOS PRODUCTOS.

La identificación de una enfermedad se podrá hacer no sólo al describir los genes del enfermo, sino también según qué genes se expresan o se encuentran reprimidos en comparación con el resto de los individuos (6). Eso nos puede dar una idea sobre la carga genética y sobre la contribución a la enfermedad de cada gen y de la proteína que codifica.

Por tanto, las anomalías pueden afectar tanto al genoma como a su expresión. Y en tal sentido es preciso señalar que la expresión se encuentra, también, directamente relacionada con el ambiente, de tal forma que las manifestaciones fenotípicas son consecuencia de la interacción entre el genoma y el ambiente en el que éste se desarrolla.



1. Influencia en la práctica clínica

Surge así el concepto de "susceptibilidad" para la enfermedad como una resultante de la carga genética y de los factores externos condicionantes. Los factores externos pueden no modificar el genoma (el mapa de genes) (7), pero sí pueden alcanzar a la transcripción y a la síntesis proteica. Se produce, así, un cambio en los genes transcritos (transcriptoma) y en la composición de las proteínas traducidas por ellos (proteoma) en los tejidos afectados.

La consecuencia es que una enfermedad o situación clínica determinada con base genética es un conjunto de datos clínicos producidos por defectos en el genoma, en la regulación de la síntesis de los productos genéticos, o en los productos genéticos mismos. Y detrás de esta situación podría identificarse una susceptibilidad o predisposición con carácter hereditario, y un desencadenante de carácter ambiental. El reto que todavía tenemos por delante es, por una parte, el conocimiento más avanzado de los genes que subyacen en la susceptibilidad a las enfermedades y, por otra, el mejor conocimiento de los factores del componente ambiental.

El ambiente tiene una gran capacidad de influencia sobre la expresión genética y modifica los productos genéticos de forma que se puede iniciar, abortar, acelerar o retrasar el desarrollo del proceso patológico.

El conocimiento progresivo de los tres elementos: genoma, transcriptoma, y proteoma puede aportar elementos moleculares decisivos a la hora de realizar un diagnóstico y un tratamiento más preciso de ciertas enfermedades (8). Por una parte, el proyecto Genoma Humano nos ha permitido aproximarnos con un elevado grado de verosimilitud a la carga genética del ser humano. Por otra, ya es posible estudiar cual es el "panorama molecular" consecuencia del genoma por cuanto podemos aproximarnos al "fenotipo molecular" del individuo gracias al estudio del nivel de expresión de un determinado gen, y del resultado final del perfil proteico. Para alcanzar un nivel de conocimientos que permita una generalización en la práctica clínica tenemos un importante obstáculo que no es la falta de tecnología sino la carencia de muestras de una cantidad suficiente de individuos clínicamente bien definidos.

En los últimos años se han hecho esfuerzos por abordar este problema. Contamos con una identificación de la secuencia del genoma humano muy próxima al 100%, con un grado de verosimilitud superior al 99% (9). Contamos con una base de datos que reúne los más de seis millones de polimorfismos de nucleótidos únicos que, probablemente, sigan aumentando. Se han hecho notables progresos en el estudio de la expresión de los genes en diferentes situaciones clínicas para conocer el "fenotipo proteico", pero el camino por delante todavía requiere de importantes esfuerzos hasta llegar a aplicar evidencias de una forma generalizada.

Pero no cabe duda que el gran avance tecnológico nos va a permitir mejorar la comprensión y definición, a nivel molecular, de la patogenia y fisiopatología de las enfermedades. Además, va a condicionar la estrategia terapéutica de las mismas. La nueva medicina molecular va a permitir, seguramente, realizar diagnósticos moleculares y tratar las enfermedades antes de que se manifiesten clínicamente. Va a revolucionar, en suma, la práctica clínica, que va a estar marcada por la nueva medicina de base molecular.

2. Influencia en la relación médico-enfermo

Son numerosas las ventajas que, tanto el enfermo como el médico, pueden obtener de este nuevo concepto de la medicina. Algunas de ellas son de índole muy práctica puesto que afectan al conocimiento de la causa última de la enfermedad, al diagnóstico, al pronóstico, al tratamiento, y a la prevención de la enfermedad (Cuadro 3).

El individuo podrá recibir consejos y recomendaciones que, basados en su carga genética, le permita eludir influencias ambientales deletéreas o prevenir riesgos específicos. Surge así la solución al diagnóstico del "riesgo individual" tan largamente acariciado por la medicina para una personalización de las recomendaciones. Es probable que podamos pronosticar el porcentaje de probabilidad de padecer una determinada enfermedad, gracias al estudio del genoma, al mismo tiempo que evaluar la influencia de las modificaciones ambientales sobre esa probabilidad de enfermar.

Podremos estar más atentos a los síntomas o signos “guía” para el diagnóstico de ciertas enfermedades, así como a los indicios precoces del desarrollo de futuras enfermedades, merced al estudio del transcriptoma y del proteoma (6). Nuestra capacidad para el diagnóstico preclínico de la enfermedad será muy superior a la actual (otra aspiración permanente de la medicina), gracias al diagnóstico de patrones conocidos en el transcriptoma y en el proteoma asociados a la enfermedad, incluso antes de que surjan las alteraciones estructurales o funcionales en los tejidos y, desde luego, antes de que surjan los síntomas.

Nuestra relación con el enfermo va a cambiar (10). Estará presidida por un conocimiento más particular de su enfermedad. El enfermo se nos va a presentar, en general, con un cuadro sindrómico cuya causa puede ser diversa por cuanto un mismo síndrome puede ser la expresión de diferentes enfermedades moleculares. Muchas enfermedades pasarán a ser consideradas como síndromes, en el más puro concepto clásico, hasta no disponer de un diagnóstico molecular. La medicina tendrá una gran parte de diagnóstico sindrómico, pero no alcanzará el diagnóstico de enfermedad si no llega al ámbito molecular. Pasaremos del síndrome clínico a la enfermedad molecular en el proceso diagnóstico.

Podremos individualizar los tratamientos y reconocer las razones por las que un mismo tratamiento en enfermedades aparentemente idénticas tiene un resultado distinto. Esto significa diseñar una estrategia personalizada basada en un determinado perfil genético. Podremos, incluso, comenzar un tratamiento antes de que la enfermedad tenga un curso clínico, decisión que el enfermo podrá tomar o no, ponderando los aspectos favorables o desfavorables de disponer de ésta información.

Pero también la relación médico-enfermo va a estar influenciada por otros aspectos derivados de un mayor y mejor conocimiento de su enfermedad, y de la base genética que la sustenta. Los problemas éticos y los problemas legales son expresión de esto. La disponibilidad de una “información sensible” y especialmente propia del individuo obliga a establecer cautelas en su utilización por los profesionales, y garantías para la persona de tal forma que no deba influir en otros aspectos de su vida (laboral, familiar, etc.) que no sea el estrictamente relacionado con la salud. Pero aun así, esta información en manos de su legítimo propietario, que no es otro que el individuo, puede llegar a tener una influencia decisiva en su toma de decisiones legales, religiosas, etc. Pudiera, además, condicionar su libertad de elección y su capacidad de decisión, una vez que fuera conocedor de una parte importante de su porvenir, con la pérdida de expectativas que ello puede arrastrar. El miedo al conocimiento y la lógica dificultad de entendimiento de estos problemas en el individuo han de ser muy tenidas en consideración.

Así las cosas, la información genética se presenta en la relación médico-enfermo como una fuente de poder, pero también como una carga que ha de ser administrada (11). La sensación que queda es que el ejercicio de la profesión médica va a requerir un enfoque distinto y que se vislumbra un cambio necesario en el perfil del profesional.

○ Las nuevas tecnologías en la clínica

Desde el comienzo de las investigaciones sobre el genoma humano, uno de los objetivos ha sido que las nuevas tecnologías y los resultados provenientes de su aplicación se encuentren disponibles rápidamente para la comunidad científica, en beneficio de los individuos. En otras palabras: servir al interés público a través del conocimiento de la biología humana.



Esto explica que el desarrollo de nuevas tecnologías se haya centrado en (12, 13):

- LA SECUENCIACIÓN DEL GENOMA PARA ALCANZAR UNA VISIÓN PREDICTIVA DE LA ENFERMEDAD.
- LA PROTEÓMICA, PARA COMPRENDER MEJOR LA ENFERMEDAD Y SUS MANIFESTACIONES.
- LAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR (BIOCHIPS) PARA IDENTIFICAR LA ANOMALÍA PRIMORDIAL DE LA ENFERMEDAD Y ALCANZAR EL DIAGNÓSTICO.
- LA APLICACIÓN DEL CONOCIMIENTO SOBRE LA POTENCIALIDAD CELULAR DEBIDA A SU CARGA GENÉTICA, PARA LAS NUEVAS TERAPIAS CON CÉLULAS PLURIPOTENCIALES.
- LA FARMACOGENÉTICA Y LA FARMACOGENÓMICA, PARA LA INDIVIDUALIZACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS.
- LA UTILIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN SOBRE LAS FUNCIONES DE LOS GENES, COMO REMEDIO TERAPÉUTICO (TERAPIA GÉNICA).

En este sentido, los esfuerzos se han encaminado hacia cuatro grandes áreas:

- EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS ENFERMEDADES.
- EL DESARROLLO DE FÁRMACOS.
- LA TERAPIA CELULAR.
- LA TERAPIA GÉNICA.

Las técnicas de biología molecular van a permitir investigar en profundidad sobre el binomio estructura-función y, eventualmente, trasladar a la clínica la aplicación de tales conocimientos, tanto provenientes del campo de la genómica funcional (transducción de señales, control de la transcripción, apoptosis, ciclo celular, interacciones celulares...) como del de la proteómica funcional (estructura de proteínas, interacciones de proteínas y receptores,...)

El beneficio que cabe esperar de la aplicación de las nuevas tecnologías se aglutinará en las siguientes áreas (14):

- CONOCIMIENTOS SOBRE LA CONTRIBUCIÓN DE LA CARGA GENÉTICA A LAS ENFERMEDADES MÁS FRECUENTES.
- NUEVOS MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE LAS ENFERMEDADES.
- CONOCIMIENTO DE LAS BASES MOLECULARES ("GENÉTICA QUÍMICA") DE LA FISIOPATOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES.
- MEJORÍA DE LOS TRATAMIENTOS, SEÑALIZANDO NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS Y ACELERANDO EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVAS DROGAS.
- POSIBILIDAD DE CONOCIMIENTO INDIVIDUAL DEL GENOMA DE FORMA RÁPIDA Y A BAJO COSTE.

La consecuencia de la aparición de nuevos marcadores biológicos de enfermedad puede aportar valor a lo largo de toda la historia natural de la enfermedad (15):

- COMO NUEVO MÉTODO DIAGNÓSTICO.
- COMO MARCADOR PRONÓSTICO.
- COMO MARCADOR-MONITOR DE LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.
- COMO PREDICTOR DE LA RESPUESTA TERAPÉUTICA.

En otra dimensión, la identificación de nuevas dianas terapéuticas puede permitir (16):

- LA DISPONIBILIDAD DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DE USO TERAPÉUTICO.
- LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE APLICACIÓN TERAPÉUTICA.
- LA SÍNTESIS DE NUEVOS FÁRMACOS.
- LA TERAPIA GÉNICA.

Sin embargo, la disponibilidad de nuevas técnicas no es sinónima de aplicación inmediata y universal. Algunas limitaciones para la aplicación de un test genético son las siguientes:

- LA EFICIENCIA O RENTABILIDAD DIAGNÓSTICA DE LA PRUEBA O EL TEST UTILIZADO.
- LA AUTÉNTICA VALIDEZ PREDICTIVA QUE TENGA EL TEST.
- LA SELECCIÓN DE GRUPOS DE POBLACIÓN O INDIVIDUOS A LOS QUE VA DIRIGIDO (FAMILIAS, GRUPOS O INDIVIDUOS DE RIESGO).

A modo de ejemplo, se pueden citar casos en los que la aplicabilidad de una nueva técnica podría estar limitada. Es el caso de una probabilidad pre-test próxima a cero, una prevalencia de la anomalía extremadamente baja, o una enfermedad intratable. En la práctica, por tanto, la aplicación de un test genético viene determinada por la utilidad o valor añadido que aporte y no meramente por la disponibilidad de la técnica.



○ Impacto del conocimiento genético en la clínica

Un campo de particular interés biomédico en la era posgenoma es el estudio del espectro de variación genética (17) y su relación con enfermedades en estudios de asociación clínica. La iniciativa de identificación sistemática de las variantes más comunes en los genes humanos y en sus regiones promotoras (lo que se han denominado "single nucleotide polymorphism" o SNP) y su análisis en poblaciones de pacientes bien fenotipificados podrá llevar a identificar factores genéticos de riesgo o combinaciones de los mismos relevantes para el desarrollo de enfermedades de causas complejas, como las cardiovasculares, la diabetes, o la enfermedad de Alzheimer. Nuestro carné de identidad de SNP podrá condicionar los hábitos recomendados de vida, así como determinar nuestra sensibilidad a fármacos o a sus efectos secundarios, lo que abre la puerta a un nuevo tipo de ensayos clínicos más estratificados que tengan en cuenta la dotación génica de los pacientes, en lo que se ha denominado farmacogenética. Todo ello será decisivo en las nuevas etapas de la medicina molecular y predictiva. Este campo constituye un ejemplo evidente de la necesaria colaboración básica/clínica, ya que incorpora desde la historia clínica de los pacientes, los bancos de sangre y tejidos, equipamientos de genotipificación de alto rendimiento y la caracterización funcional de los polimorfismos identificados en modelos experimentales.

Otros campos esenciales en el ámbito de la genómica funcional son el estudio del "transcriptoma" y del "proteoma", el conjunto de ARN mensajeros (ARNm) y de proteínas, respectivamente, que se expresan en una célula determinada (18). A diferencia del genoma, que es independiente de contexto, la expresión de ARNm y proteínas depende del tipo celular y de las circunstancias fisiológicas o patológicas concretas. Se trata, pues, de abordar la descripción sistemática de los programas de expresión génica en distintos tipos celulares, y de su regulación en distintos estados fisiopatológicos y durante el desarrollo. En el caso de las proteínas, el objetivo se extiende a entender su localización y dinámica celular, sus interacciones mutuas y su estructura tridimensional. Todo ello va a suponer también un gran esfuerzo en el mejor conocimiento de los mecanismos de modulación de la transcripción génica, así como de los mecanismos de señalización celular que los gobiernan y en cuya disfunción tienen su raíz un gran número de enfermedades. Un objetivo esencial es entender mejor las redes de interacciones de proteínas que están implicadas en el mantenimiento y la modulación de las principales funciones celulares, como la proliferación celular, la respuesta a diversas señales fisiológicas (transducción de señales), o la adquisición y mantenimiento del estado de diferenciación y de las funciones específicas de tejido.

El mejor conocimiento del funcionamiento de estas redes a nivel celular, así como de la repercusión fisiológica a nivel del organismo completo de cambios en la expresión o función de genes, mediante el desarrollo de modelos animales, son también nuevas fronteras de la investigación posgenoma esenciales para construir hipótesis sobre la etiología de enfermedades y para desarrollar nuevos métodos diagnósticos y terapéuticos.

Este panorama presenta varios aspectos que merece la pena destacar. Por una parte, la indudable potencialidad de las aplicaciones futuras de estos conocimientos y metodologías. Por ejemplo, la caracterización fenotípica a nivel molecular de enfermos de cáncer u otras enfermedades, que pueda dar información sobre su pronóstico y aconsejar estrategias terapéuticas; los nuevos fármacos que se derivarán del mejor conocimiento de los sistemas de señalización celular, o las posibles aplicaciones de la utilización de células precursoras para la reparación de órganos y tejidos dañados. Por otra, destaca la importancia creciente de las aproximaciones multidisciplinarias (19). La complejidad de los problemas que hoy aborda la investigación en biomedicina va a requerir, cada vez más, la colaboración de, entre otros, biólogos moleculares, especialistas en genética humana, epidemiología molecular, biología celular, transducción de señales, modelos animales, biología del desarrollo, neurobiología, y en las nuevas metodologías genómicas, así como, de nuevo, acceso a excelentes bancos de tejidos y muestras de pacientes bien caracterizados.

La genómica y proteómica van a permitir profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares, bioquímicos, celulares, genéticos, fisiopatológicos y epidemiológicos (epidemiología molecular) de las enfermedades y problemas de salud, y establecer estrategias para su prevención y tratamiento. La información generada con la secuencia del genoma humano y de otros organismos, y la expansión de las tecnologías para el análisis de proteínas, expresión de genes y sus variantes posibilitan redefinir la organización de los sistemas biológicos y profundizar en los mecanismos implicados en el desarrollo de la enfermedad. Los conocimientos básicos alcanzados por la medicina genómica abren oportunidades para su traslación en la mejora del diagnóstico y caracterización de los pacientes, y en el planteamiento de nuevas dianas terapéuticas. Mediante estas herramientas, la investigación biomédica ha de satisfacer la demanda social y clínica de una medicina más personalizada y eficaz. En otra área de investigación especialmente activa, el reconocimiento de la plasticidad de las células madre para la regeneración y diferenciación posibilita su uso en medicina reparadora.

Estos avances en el conocimiento fundamental sólo se traducirán en calidad de vida y en bienestar para las personas cuando puedan ser aplicados para mejorar la prevención, el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades, lo cual supone la necesidad de coordinación con el sector industrial.

En un repaso breve sobre los grupos de enfermedades de mayor morbilidad, se podrían definir los siguientes aspectos en los que la genómica y proteómica va a resultar de especial trascendencia.

1. Cáncer

Como es bien conocido, el cáncer constituye uno de los mayores problemas de salud en el mundo desarrollado y su impacto negativo incide de manera especial en los grupos humanos más desfavorecidos a nivel económico. En nuestro país el cáncer afecta a unos 150.000 españoles anualmente, de los cuales la mitad sobrevivirán a su enfermedad más de cinco años. En términos del riesgo individual, uno de cada tres españoles y una de cada cinco españolas serán diagnosticados de cáncer en un momento de su vida. Finalmente, aunque la supervivencia del cáncer haya mejorado significativamente en nuestro país en los últimos veinte años, con datos procedentes de los registros de tumores de población, queda mucho por hacer para mejorar su prevención, diagnóstico y tratamiento tanto en el ámbito de la organización sanitaria como también en el ámbito de la investigación.

Las áreas en las que la genómica y proteómica va a realizar aportaciones trascendentes a la Oncología Clínica son (20, 21):

- | | | |
|---|--|--|
| ❖ Elucidación de los mecanismos moleculares y celulares en el desarrollo y progresión del cáncer. | nuevos modelos alternativos que emulen de manera más apropiada la enfermedad humana y permitan un mejor control de la activación o inactivación génica <i>in vivo</i> . | y caracterización genotípica de susceptibilidad a diferentes tipos de tumores y programas de consejo genético. |
| ❖ Desarrollo y análisis de rastreos genómicos y proteómicos masivos para caracterizar procesos tumorales e identificar patrones de utilidad en diagnóstico, pronóstico y tratamiento. | ❖ Aplicación de tecnología molecular y celular al análisis de grandes series de pacientes para diagnóstico inicial de mutaciones, confirmación de la remisión clínica (detección de enfermedad mínima residual) y diagnóstico de mutaciones en recaídas. | ❖ Desarrollo y evaluación de nuevos agentes farmacológicos antitumorales, con especial énfasis en la selección de agentes activos en estadios iniciales de desarrollo tumoral, la incorporación de tecnologías de apoyo (e.g. farmacogenómica, proteómica) para el óptimo desarrollo preclínico y clínico de los agentes seleccionados, y la individualización del tratamiento farmacológico según factores pronósticos. |
| ❖ Explotación de modelos murinos para análisis de bases genéticas y moleculares de la enfermedad, identificación de factores involucrados en la progresión tumoral, identificación de nuevas dianas de potencial terapéutico y ensayos preclínicos. Desarrollo de | ❖ Desarrollo y estandarización de las metodologías y protocolos utilizables en epidemiología molecular, diagnóstico y prevención de cáncer familiar y esporádico, | |

2. Enfermedades Cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de morbi-mortalidad en España. Los avances terapéuticos, en el conocimiento epidemiológico, de la fisiopatología y la biología vascular han contribuido de forma muy significativa a la generación de conocimiento nuevo en biología y biomedicina durante las dos últimas décadas. Se han sentado las bases del conocimiento molecular de procesos fisiológicos y fisiopatológicos tales como la regulación del tono vascular, la inflamación o la arteriosclerosis.

La elevada prevalencia de factores de riesgo de cardiopatía isquémica como la hipertensión, la diabetes, el consumo de tabaco o la hipercolesterolemia son un hecho constatado. Es importante señalar asimismo la insuficiencia cardíaca, derivada en parte de la decreciente letalidad por cardiopatía isquémica, que trae como consecuencia su cronificación y aumento de incidencia en la población de más de 65 años.

Las áreas de influencia más importantes de la genómica y proteómica en la Medicina Cardiovascular podrían ser (22):

- | | | |
|---|---|--|
| ❖ Contribución al desarrollo de modelos experimentales, celulares y animales de enfermedad cardiovascular. | ❖ Hipertensión esencial, con sus bases genéticas y mecanismos moleculares de su génesis y daño multiorgánico. | ❖ Marcadores bioquímicos, genéticos y clínicos de la cardiopatía isquémica. |
| ❖ Disfunción endotelial como sustrato común de arteriosclerosis, hipertensión y diabetes. | ❖ Establecimiento de las bases genéticas y moleculares de las miocardiopatías y de las arritmias. | ❖ Diabetes y enfermedad arterial. Síndrome metabólico y resistencia a la insulina como factores críticos de desarrollo de enfermedad vascular. |
| ❖ El proceso de arteriosclerosis: modificación de lipoproteínas nativas, mecanismos moleculares del inicio, progresión y establecimiento de la placa de ateroma. Mecanismos de inestabilidad de la placa y formación de trombo. | ❖ Regeneración de tejido vascular y miocárdico por células totipotentes | ❖ Nuevas estrategias terapéuticas en la insuficiencia cardíaca, arritmias, cardiopatía isquémica, hiperlipidemia y obesidad. |
| | ❖ Marcadores genéticos y proteicos de aplicación en cribado poblacional de la enfermedad cardiovascular. | |

3. Enfermedades del Sistema Nervioso y Mentales

La morbi-mortalidad por enfermedades del Sistema Nervioso ha experimentado un gran incremento en los últimos años. Las enfermedades neurodegenerativas, especialmente las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, son enfermedades de carácter crónico que presentan una alta prevalencia y ocasionan un elevado grado de incapacidad. Sus repercusiones a nivel humano y los costes económicos y sociales que generan su manejo diagnóstico y el tratamiento son de enormes dimensiones. Estos últimos irán creciendo al aumentar el número de individuos afectados asociado al envejecimiento progresivo y rápido de nuestra población. La patología cerebrovascular aguda o ictus constituye un problema asistencial complejo y creciente. En la actualidad representan una de las dos primeras causas de mortalidad, pero sobre todo, la primera causa de incapacidad en el adulto y la segunda de demencia; su impacto social está en aumento debido al incremento de edad de la población y al cambio de la forma de vida rural a la urbana. El dolor es la primera causa de búsqueda de ayuda médica, y es un problema social de primera magnitud que tiene repercusiones que trascienden al mundo médico y se extienden al ámbito socioeconómico. Las enfermedades neuromusculares producen en una elevada proporción de los casos invalidez por debilidad muscular progresiva y crónica y son un problema sociosanitario importante. Los trastornos mentales y del comportamiento también han experimentado un incremento sustancial en los últimos tiempos y constituyen un problema médico y socioeconómico especialmente relevante, con un 25% de la discapacidad y un 9% de la carga total de enfermedad.

Las aportaciones más relevantes en esta área se han de producir en (23, 24):

❖ Bases celulares, moleculares, genéticas y farmacológicas de las enfermedades neurodegenerativas, especialmente en la enfermedad de Alzheimer y otras demencias, así como en la enfermedad de Parkinson y otros trastornos del movimiento.	❖ Bases genéticas, celulares y moleculares de la neuroinmunología.	❖ Bases moleculares de los componentes dimensionales de la personalidad
❖ Alteraciones moleculares, celulares, diagnóstico y pronóstico en el ictus.	❖ Mecanismos celulares, moleculares y farmacología del dolor.	❖ Modelos animales y celulares para el estudio de enfermedades neurológicas y psiquiátricas. Aislamiento y manipulación de células progenitoras orientadas al análisis e intervención del programa de diferenciación hacia tejido nervioso y muscular; modelos experimentales de trasplantes de células y tejidos. Desarrollo de vectores.
❖ Bases celulares y moleculares de la regeneración axonal.	❖ Bases moleculares y genéticas de las alteraciones del desarrollo y evolución del sistema nervioso, con especial énfasis en el retraso mental y los trastornos del aprendizaje y la comunicación en el niño.	❖ Farmacogenómica y farmacogenética en el tratamiento de las enfermedades neurológicas y psiquiátricas. Desarrollo de nuevos fármacos en neurofarmacología y psicofarmacología. Barrera hematoencefálica y vehiculización.
❖ Bases genéticas y moleculares de las epilepsias.	❖ Trastornos psicóticos: bases genéticas, celulares y moleculares.	
❖ Enfermedades neuromusculares: bases celulares, moleculares, y genéticas.	❖ Trastornos del espectro ansioso: bases moleculares, genéticas y farmacológicas.	
	❖ Bases genéticas y moleculares de las conductas adictivas y trastornos alimentarios.	
	❖ Trastornos afectivos: bases moleculares, genéticas, y farmacológicas.	

4. Enfermedades Infecciosas y SIDA

Las enfermedades infecciosas son la principal causa de morbilidad en países industrializados y de morbi-mortalidad en países en vía de desarrollo, y tienen un enorme impacto económico y social. Además, la emergencia de nuevas enfermedades como el SIDA y la reemergencia de otras enfermedades consideradas infrecuentes o controladas en nuestro ámbito suponen un desafío científico, sanitario y social. Por ello, en este campo se han de priorizar determinadas patologías, pero también deben organizarse estructuras que permitan una rápida respuesta a las nuevas enfermedades emergentes y re-emergentes desde los enfoques epidemiológico, de investigación básica, diagnóstico y de desarrollo de fármacos y vacunas.

En el campo de las enfermedades infecciosas, los enfoques de la genómica y proteómica se van a centrar en los siguientes aspectos:

❖ Genómica comparada de microorganismos de especial relevancia para la salud humana.	❖ Estudio de la respuesta inmune innata y adaptadora frente a los distintos gérmenes.	❖ Estudio de las bases moleculares de la resistencia a fármacos.
❖ Estudio molecular de las interacciones microorganismo-hospedador.	❖ Desarrollo de técnicas moleculares para diagnóstico rápido microbiológico.	❖ Estudio de los mecanismos de toxicidad de fármacos.
❖ Determinación de los factores de virulencia.	❖ Establecimiento de nuevas dianas de acción de fármacos.	❖ Desarrollo de vacunas y de moléculas inmunomoduladoras.

5. Enfermedades genéticas, Modelos de enfermedad y Terapia

Los genes responsables de las principales enfermedades monogénicas han sido identificados durante los últimos 20 años de investigación genómica, pero existen todavía más de ocho mil rasgos genéticos, de los que los genes y las mutaciones responsables de enfermedad todavía no han sido identificados. En muchos casos se trata de procesos que afectan a pocos pacientes, en lo que se ha llevado a denominar como “enfermedades raras” (ER). La mayoría de las ER son de origen genético. La identificación de los genes y mutaciones responsables de estas enfermedades es fundamental para establecer el conocimiento de las bases fisiológicas de muchas vías metabólicas y para avanzar en el desarrollo de nuevas formas de tratamiento, que impliquen no sólo a estas enfermedades sino que se extiendan también a enfermedades comunes que afectan a gran parte de la población. Mucho más relevantes para la salud pública, desde el punto de vista del número de personas afectadas, son las enfermedades multifactoriales, que son la mayoría de las enfermedades del adulto, incluyendo las enfermedades auto inmunes, cardiovasculares, respiratorias, psiquiátricas, neurodegenerativas y el cáncer, entre otras. En estas enfermedades, una o más variantes genéticas en determinados loci condicionan diferentes grados de susceptibilidad a la enfermedad en cada individuo, modificables también por efectos ambientales. La identificación de dichas variantes genéticas y la relevancia específica de su contribución al desarrollo de la enfermedad es actualmente posible con los recursos genómicos existentes (25).

Para entender la fisiopatología de las enfermedades es necesario desarrollar modelos a nivel celular o de organismo. El tratamiento de algunas enfermedades precisa de la modificación de genes específicos o de la reprogramación de los perfiles de expresión génica. Es necesaria la producción de vectores virales y no virales para terapia génica y de estrategias basadas en el empleo de oligonucleótidos u otro tipo de interceptores de la expresión génica. Las investigaciones con células madre que se han realizado en el ratón han mostrado que puede producirse la regeneración de tejidos u órganos de un modo eficaz. A medida que se tenga una mayor capacidad para reconducir la diferenciación celular de células madre de la médula ósea y de otros tejidos, será posible plantear su empleo en la regeneración celular en patologías de elevada prevalencia.

Las áreas de mayor interés en el ámbito de las genómica y proteómica de las enfermedades metabólicas-hereditarias serían:

- ❖ Identificación de la función de los genes y las proteínas; la variabilidad de secuencias; la variabilidad de expresión a nivel de RNA y proteína en el desarrollo, a nivel tisular y en situaciones patológicas; la localización subcelular; las interacciones moleculares de las proteínas; y la modulación de la actividad proteica en un contexto de redes interactivas.
- ❖ Investigación de los mecanismos moleculares de las enfermedades: regulación del ciclo celular, señalización inter- e intracelular, apoptosis u otro tipo de muerte celular con relevancia en procesos patológicos, diferenciación celular y senescencia, reparación de DNA, y resistencia a fármacos.
- ❖ Aislamiento y manipulación de células progenitoras orientadas al análisis e intervención del programa de diferenciación hacia diversos tejidos; modelos experimentales de trasplantes de células y tejidos.
- ❖ Desarrollo y caracterización de modelos experimentales (animales y celulares) para el estudio de enfermedades humanas (sobreexpresión, cambio de aminoácidos, knockouts, knockins y knockouts condicionales).
- ❖ Desarrollo de intervenciones terapéuticas en modelos animales in vivo.
- ❖ Estudios fisiológicos, farmacológicos, genéticos y moleculares en modelos animales de enfermedad que ya están establecidos.
- ❖ Estudio de factores ambientales en modelos de enfermedades humanas.
- ❖ Desarrollo de vectores virales y no virales para la corrección de defectos genéticos o de sus consecuencias a nivel celular, tisular o de organismo.
- ❖ Desarrollo de tecnologías de interferencia de RNA (RNAi) para identificar la función de genes, desarrollar modelos de enfermedad y corrección terapéutica.
- ❖ Desarrollo de métodos de análisis de variantes genéticas implicadas en susceptibilidad a enfermedades comunes humanas y enfermedades genéticas específicas.
- ❖ Identificación de los genes y mecanismos moleculares responsables de enfermedades hereditarias raras.

6. Enfermedades crónicas e Inflamación

Las Enfermedades crónicas incluyen diversas entidades nosológicas de alta prevalencia, que son causas relevantes de morbi-mortalidad y coste socioeconómico. Entre estos procesos se encuentran enfermedades endocrinas como la diabetes, digestivas como la cirrosis, respiratorias como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y osteoarticulares como las enfermedades reumáticas y la osteoporosis. La inflamación constituye el mecanismo patogénico común, subyacente a la mayoría de estos procesos. En los últimos años se han producido avances sustanciales en el conocimiento fundamental de los mecanismos celulares, moleculares y genéticos de la inflamación. Los conocimientos básicos alcanzados por la medicina genómica abren oportunidades para su traslación a mejorar el diagnóstico y caracterización de los pacientes, y a plantear nuevas estrategias terapéuticas.

A medida que se identifica la estrecha relación entre determinados genes y enfermedades, es posible definir la evolución y respuesta al tratamiento de subgrupos de pacientes. El conocimiento de las interacciones genético-ambientales ofrece la posibilidad de identificar desencadenantes del inicio o la reactivación de los procesos en huéspedes susceptibles. La viabilidad futura de esta área requiere de abordajes temáticos integrales y de la transferencia rápida y eficaz de resultados desde el laboratorio al diagnóstico y tratamiento de los pacientes y a la industria.

Las mayores aportaciones de la Genómica y proteómica en los aspectos clínicos de estas enfermedades se podrían realizar en los siguientes epígrafes:

- | | | |
|--|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ❖ Mecanismos implicados en la activación, control de crecimiento y apoptosis, migración y recirculación de células inflamatorias en modelos experimentales y en enfermedades humanas. | <ul style="list-style-type: none"> ❖ Mecanismos genéticos, moleculares y celulares de la fibrogénesis, y de los mecanismos de progresión a cirrosis. | <ul style="list-style-type: none"> ❖ Mecanismos de rechazo y control de la tolerancia del injerto. Trasplante de órganos y tejidos: control del crecimiento y diferenciación de células madre empleadas en medicina reparativa y en terapia génica. |
| <ul style="list-style-type: none"> ❖ Mecanismos desencadenantes de lesión tisular inducidos por células inflamatorias. Pautas de reprogramación e inmunomodulación terapéutica. | <ul style="list-style-type: none"> ❖ Mecanismos moleculares y celulares de fracaso en la biocomunicación hormonal y su relevancia patogénica y terapéutica. Bases genéticas y moleculares de la diabetes mellitus y obesidad. | <ul style="list-style-type: none"> ❖ Medicina reparativa con células y moduladores de la respuesta biológica para la prevención y recuperación del daño tisular tras inflamación. |
| <ul style="list-style-type: none"> ❖ Alteraciones producidas en los mecanismos de presentación y de activación tras el reconocimiento de los autoantígenos. | <ul style="list-style-type: none"> ❖ Mecanismos del envejecimiento y senescencia celular y sus implicaciones en la patología. | <ul style="list-style-type: none"> ❖ Farmacogenómica y farmacogenética en el tratamiento de las enfermedades crónicas y en la modulación de los procesos inflamatorios. |
| <ul style="list-style-type: none"> ❖ Mecanismos involucrados en la activación de las respuestas frente a agentes infecciosos y sus implicaciones en procesos inflamatorios crónicos. Caracterización de las alteraciones de las células T reguladoras implicadas en el control de los procesos autoinmunes e infecciosos. | <ul style="list-style-type: none"> ❖ Mecanismos celulares y moleculares de daño del tejido óseo y sus implicaciones etiopatogénicas y diagnósticas. | |
| | <ul style="list-style-type: none"> ❖ Desarrollo de nuevos marcadores biológicos para la estimación del riesgo, el diagnóstico y la valoración pronóstica en estadios subclínicos y clínicos de la enfermedad. | |



○ Biología celular aplicada al diagnóstico y tratamiento

El gran progreso en el estudio (diagnóstico y tratamiento) de poblaciones o individuos con riesgo de padecer enfermedades tiene su base, generalmente, en el estudio de los genes que se expresan y en el estudio de los polimorfismos debido a que ambas cosas son las que tienen auténtica trascendencia funcional. La expresión de los genes (más que la propia dotación génica) y los polimorfismos existentes en ellos es lo que explica y condiciona las diferencias de los individuos en términos de susceptibilidad a las enfermedades o de respuesta a los tratamientos.

1. Expresión de los genes

No todos los genes de los que el individuo es portador se expresan; sólo lo hace una fracción de ellos. La expresión génica es el mecanismo por el que la información contenida en el ADN da lugar al ARNm y, finalmente, este proceso se traduce en la síntesis de una proteína.

La expresión génica permite a la célula adaptarse y responder a los estímulos procedentes de otras células o del ambiente. La importancia que tiene conocer cuáles son los genes "activos" es trascendental para explicar el perfil genético de cada enfermedad (26).

No ha sido fácil disponer de técnicas que permitan estudiar muchos genes al mismo tiempo. Las técnicas de "Southern blot" y de "Northern blot" (hibridación de una sonda con ADN y ARN, respectivamente) permiten estudiar un conjunto de genes. Pero las nuevas técnicas de "microarrays" permiten analizar miles de genes en un único experimento (27). La técnica se fundamenta en la complementariedad de las dos cadenas de los ácidos nucleicos. El microarray es un soporte al que se han unido fragmentos de genes, oligonucleótidos (fragmentos cortos de ADN), o productos procedentes de PCR, por lo que el "encuentro" con material procedente del tejido del enfermo permite identificar (gracias a la complementariedad) aquellos genes que están presentes. Así se

consigue la identificación de genes presentes en tejidos normales o enfermos, comparando la carga y la expresividad de cada una de las muestras.

Mediante esta técnica es posible detectar pérdidas o ganancias cromosómicas, polimorfismos, mutaciones y cambios en los niveles de expresión de los genes. Estos resultados nos pueden permitir establecer si una persona tiene un “patrón” o “perfil” de enfermedad, es susceptible de desarrollarla, o puede responder o no a un tratamiento.

2. Polimorfismos

Aunque la mayor parte de la secuencia del genoma es homogénea (28), alrededor de uno de cada 100-1.500 nucleótidos es polimórfico (tiene una base en un cromosoma distinta a la del otro cromosoma). Tales polimorfismos tienen consecuencias sobre la expresión de la proteína o sobre su estructura lo que hace que, en la práctica, sólo los gemelos monocigóticos tengan una carga genética altamente semejante, mientras que hay diferencias muy notables entre los individuos de la especie humana.

En la práctica sería posible definir cuál es la variación genómica que contribuye a la susceptibilidad de la enfermedad o a la respuesta/resistencia al tratamiento (29). La variación genética, traducida en la función o expresión de la proteína, puede actuar como reguladora o modificadora del riesgo de desarrollar la enfermedad. Es la influencia del genotipo sobre el riesgo de enfermedad, si bien el gen sólo actúa –generalmente– modificando el riesgo, siendo necesario el concurso de factores ambientales como desencadenantes. Además un sólo gen no suele ser responsable de todo el riesgo de la enfermedad, siendo así que el riesgo genético global es la consecuencia de los polimorfismos de muchos genes que codifican las proteínas implicadas. Este fenómeno se corresponde con las enfermedades poligénicas.

Esto que ocurre en términos generales, no tiene lugar en las enfermedades monogénicas en las que la presencia de un solo gen puede ser suficiente para el desarrollo de la enfermedad. Aún así, las condiciones ambientales (o el estilo de vida) pueden influir en la intensidad de las manifestaciones clínicas. Esta situación no es la común, ya que las mutaciones tienen una frecuencia baja, a diferencia de los polimorfismos.

Estas variaciones también pueden ser útiles para identificar dianas terapéuticas, de lo que se ocupa la farmacogenómica, o para explicar (y eventualmente predecir) el grado de respuesta farmacológica en un tratamiento. Este fenómeno se debe a que las enzimas que metabolizan un fármaco están codificadas por genes polimórficos, y algunos de estos genotipos son determinantes para que el individuo metabolice mejor o peor los fármacos. El estudio de la respuesta farmacológica del individuo según el genotipo del individuo se conoce como farmacogenética. La aplicación de la farmacogenética puede permitir identificar a aquellos que podrían responder mal o bien a un tratamiento determinado, lo que obligaría a modificar la dosis o el propio fármaco.

○ Bibliografía

1. Chakravarti, A.: To a future of genetic medicine. *Nature* 2001; 409:822-823.
2. Zinder, M.; Gerstein, M.: Defining genes in the genomics era. *Science* 2003; 300:258-260.
3. Internacional Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409:860-921.
4. Venter, J. C.; Adams, M. D.; Myers, E. W.; *et al.*: The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291:1304-1351.
5. Lockhart, D. J.; Winzeler, E. A.: Genomics, gene expresión and DNA arrays. *Nature* 2000; 405:827-836.
6. Gerling, I. C.; Solomon, S. S.; Bryer-Ash, M.: Genomas, transcriptomas y proteomas. *Medicina molecular y su efecto sobre el ejercicio de la medicina. Arch Intern Med (ed esp)* 2003; 1:3-11.
7. The Internacional Human Genome Mapping Consortium. A physical map of the human genome. *Nature* 2001; 409:934-941.
8. Pandey, A.; Mann, M.: Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000; 405:837-846.
9. Emmett, A.: The human genome. *Scientist* 2000; 14:1-19.
10. Lehmann, L. S.; Weeks, J. C.; Flar, N.; Biener, L.; Garber, J. E.: Disclosure of familial genetic information: perceptions of the duty to inform. *Am J Med* 2000; 109:705-711.
11. Collins, F. S.: Shattuck lecture: medical and societal consequences of the human genome Project. *N Engl J Med* 1999; 341:28-37.
12. Wolf, C. R.; Smith, G.; Smith, R. L.: Pharmacogenetics. *Br Med J* 2000; 320:987-990.
13. Roses, A. D.: Pharmacogenetics. *Hum Mol Genet* 2001; 10:2261-2267.
14. Ommen, G. J. B.; Bakker, E.; Dunnen, J. T.: The human genome project and the future of diagnostics, treatment, and prevention. *Lancet* 1999; 354 (suppl1):SI5-SI10.
15. Todd, J. A.: Interpretation of results from genetic studies of multifactorial diseases. *Lancet* 1999; 354 (suppl 1):SI15-SI16.
16. Smith, A. E.: Gene therapy: where are we? *Lancet* 1999; 354(suppl1): SI1-SI4.
17. Baltimore, D.: Our genome unveiled. *Nature*, 2001; 409:814-816.
18. Hamadeh, H.; Afshari, C. A.: Gene chips and functional genomics. *Am Sci* 2000; 88:508-515.
19. Roses, A. D.: Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature* 2000; 405:857-865.
20. Futreal, P. A.; Kasprzyk, A.; Birney, E.; Mullikin, J. C.; Wooster, R.; Stratton, M.: Cancer and genomics. *Nature* 2001; 409:850-852.
21. Golub, T. R.; Slonim, D. K.; Tamayo, P.; *et al.*: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expresión monitoring. *Science* 1999; 286:531-537.
22. Nabel, E. G.: Cardiovascular disease. Guttmacher AE, Collins FS (Eds). *Genomic Medicine. New Engl J Med.* 2003; 349:60-72.
23. Warner, L. E.; Garcia, C. A.; Lupski, J. R.: Hereditary peripheral neuropathies: clinical forms, genetics and molecular mechanisms. *Annu Rev Med* 1999; 50:263-275.
24. Owen, M. J.; Cardno, A. G.: Psychiatric genetics: progress, problems, and potential. *Lancet* 1999; 354 (suppl 1):SI11-SI14.
25. Motulsky, A. G.: If I had a gene test, what would I have and who would I tell? *Lancet* 1999; 354 (suppl 1): SI35-SI37.
26. Jimenez-Sanchez, G.; Childs, B.; Valle, D.: Human disease genes. *Nature* 2001; 409:853-855.
27. Shoemaker, D. D.; Schadt, E. E.; Armour, C. D.; *et al.*: Experimental annotation of the human genome using microarray technology. *Nature* 2001; 409:922-927.
28. The International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; 409:928-933.
29. Risch, N. J.: Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000; 405:847-856.



CUADRO 1

**INFLUENCIA DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR
EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES**

ANTES SIGLO XX	SIGLO XX (1ª PARTE)	SIGLO XX (2ª PARTE)	DESPUÉS SIGLO XX
Diagnóstico Tradicional	Diagnóstico Diferencial	Diagnóstico en grupos de riesgo	Diagnóstico Molecular
	Diagnóstico de Laboratorio	Diagnóstico Individual	Diagnóstico de susceptibilidad
	Diagnóstico por Imagen		

----- DIAGNÓSTICO CLÍNICO ----- | ----- DIAGNÓSTICO PRECLÍNICO -----

CUADRO 2

**NIVELES DE DIAGNÓSTICO
DE LAS ALTERACIONES DE ORIGEN GENÉTICO**

CONCEPTO	NIVEL	DETECCIÓN
Genoma	Carga Genética	Gen
Transcriptoma	Transcripción de la Carga Genética	Expresión del Gen
Proteoma	Perfil Proteico Definido	Proteínas Finales

CUADRO 3

**INFLUENCIA DE LOS NUEVOS CONOCIMIENTOS EN ALGUNOS
ASPECTOS CLÍNICOS (MODIFICADO DE GERLING ET AL)**

POSIBILIDAD	SÍNTOMAS	DIAGNÓSTICO	PROTEOMA	TRANSCRIPTOMA	GENOMA
Detección precoz	-	+	++	+++	++++
Intervención preventiva	-	+	++	+++	++++
Predicción de una verdadera enfermedad	+++++	++++	+++	+++	++
Tratamiento precoz	-	+	++	+++	++++
Eficacia probable de un tratamiento personalizado	+	++	+++	++++	++++
Eficacia probable de un tratamiento personalizado	+	+	++	+++	++++

Capítulo III:

El desarrollo de los nuevos fármacos en la era postgenómica

Autores:

Rubén Moreno Palanques

- Doctor en Medicina, Universidad de Valencia y Especialista en Anatomía Patológica.
Director General, Centro Superior de Alta Tecnología para la Investigación en Biomedicina y Transplante de Tejidos y Órganos de la Comunidad Valenciana.



El desarrollo de nuevos fármacos en la era postgenómica

○ Introducción

Toda investigación dirigida al descubrimiento y desarrollo de un nuevo fármaco pretende encontrar una molécula, aún por descubrir, que inhiba o active una enzima o un receptor por ejemplo, del modo que deseamos y sin efectos secundarios. El primer paso en el difícil camino hacia el éxito, es elegir una diana apropiada frente a la que dirigir nuestro futuro fármaco.

Posteriormente, hay que proceder a un costoso y largo proceso de cribado para encontrar un candidato prometedor entre el vasto universo de compuestos naturales y sintéticos disponibles. Analizar un gran número de compuestos para ver si tienen el efecto bioquímico o celular apropiado, es uno de los primeros pasos en el desarrollo de fármacos, por lo que los métodos para hacer los cribados más rápidos, más efectivos y menos costosos están en continuo desarrollo. Una respuesta positiva en la primera ronda de cribado identifica los compuestos "hit" primarios. Estas moléculas son sometidas a varias rondas de cribado para ver si tienen características fisicoquímicas y farmacológicas que no sean demasiado incompatibles para hacer un fármaco. Si pasa este filtro, un "hit" se convierte en un "lead" o compuesto cabeza de serie.

Estos compuestos siguen nuevas rondas de refinamiento y de cribado biológico antes de pasar a la fase de ensayo clínico. Eventualmente, y después de 12-15 años desde que se inicia el proceso, y de unos costes de desarrollo cercanos a 1.000 M€, el cabeza de serie puede aprobarse como fármaco. En este sentido, las prioridades que se ha establecido la industria farmacéutica son crear nuevas entidades químicas (NEQ) y mejores fármacos (pasando de 0,5 a 2-4 NEQ por año para el 2005), asegurarse que el 30% de todos los fármacos lanzados al mercado alcancen una facturación de 1.000 M€ anuales, y que el ciclo de I+D se reduzca de 12 a 7 años o menos. A pesar de que los métodos de cribado de alto rendimiento y la robotización han acelerado el proceso, el principal cuello de botella para alcanzar estos objetivos es el ritmo necesariamente secuencial de los experimentos de laboratorio.

El reto principal en el desarrollo de nuevos fármacos en la era postgenómica es la identificación de compuestos con la especificidad suficiente para explotar el nuevo escenario derivado del conocimiento del genoma humano y otros genomas.

○ Elección de una enfermedad y una diana biológica

1. Selección racional de nuevas dianas

El conocimiento de muchas de las bases moleculares de las enfermedades humanas más prevalentes, permite la identificación de dianas moleculares críticas en las rutas que controlan los procesos biológicos que están alterados. La actividad de estas dianas puede, en principio, modularse por inhibición o estimulación en el caso de una enzima, o mediante antagonistas o agonistas en el caso de un receptor, según lo requiera la ruta de que se trate.

El primer paso en el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos es la identificación de la diana molecular apropiada que sea crítica para el control de la enfermedad de interés. Típicamente, esto se hace mediante un cuidadoso estudio de la literatura científica más reciente. El amplio conocimiento existente sobre las funciones biológicas, que sigue en constante crecimiento, ha abierto una multitud de áreas nuevas en el descubrimiento de fármacos que no existían previamente, incluyendo el campo de los agentes antiinfecciosos, cardiovascular, metabólico, oncológico, inmunológico, urinario, y neurológico. El tratamiento oncológico, por ejemplo, ha estado dominado durante décadas por agentes citotóxicos, cuya eficacia dependía del hecho que las células tumorales proliferan, mientras que la mayoría de las células normales no lo hace. Sin embargo, la necesaria proliferación normal de las células de la médula ósea ha hecho que este tipo de terapia sea a menudo poco efectiva debido a su toxicidad dosis-dependiente. El conocimiento de los mecanismos moleculares ha llevado al descubrimiento de una serie de dianas para el cáncer que son citostáticas y específicas

de tumores, por estar dirigidas frente a mecanismos tumorales específicos. Entre los compuestos frente a dianas que se están investigando en fase de ensayo clínico, e incluso ya en el mercado están:

- INHIBIDORES DE RECEPTORES TIROSINA QUINASA QUE BLOQUEAN LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR QUE LLEVA A LA PROLIFERACIÓN INDEFINIDA Y AUSENCIA DE MUERTE CELULAR [1-3].
- INHIBIDORES DE PROTEOSOMAS QUE NO PERMITEN LA ACTIVACIÓN DE PROTEÍNAS NECESARIAS PARA LA PROLIFERACIÓN Y SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS TUMORALES [4].
- INHIBIDORES DE METALOPROTEASAS PARA LIMITAR LA CAPACIDAD DEL TUMOR DE INVADIR EL ESPACIO EXTRACELULAR [5].
- AGENTES ANTIANGIOGÉNESIS PARA EVITAR LA VASCULARIZACIÓN DEL TUMOR NECESARIA PARA SU CRECIMIENTO [6].
- INHIBIDORES DE LA FARNESIL TRANSFERASA PORQUE LA SUPERVIVENCIA DE LOS TUMORES DEPENDE MUCHO MÁS DE LA FARNESILIZACIÓN [7].
- INHIBIDORES DE LA TELOMERASA PARA EVITAR QUE LAS CÉLULAS TUMORALES SE REPRODUZCAN INDEFINIDAMENTE [8,9].

El campo de los agentes antivirales también se ha beneficiado de la intensa investigación sobre los mecanismos que subyacen en el proceso de infección. Para el virus HIV se han utilizado dianas como la transcriptasa reversa, proteasa, integrasa, Rev y tat [10].

2. Evaluación de viejas dianas con las nuevas tecnologías disponibles

El descubrimiento de subtipos de enzimas o receptores ha llevado a la reevaluación de muchas dianas moleculares antiguas. En algunos casos, lo que se creía que era una enzima para un sustrato determinado o un receptor para un ligando particular, ha resultado tener diversas formas de presentación, que a menudo difieren en el papel fisiológico que desarrollan. Los compuestos o fármacos que se habían descubierto y comercializado para tratar una enfermedad, pueden tener efectos secundarios por la acción no deseada del compuesto sobre un subtipo particular que es diferente del responsable del efecto terapéutico. El descubrimiento de un compuesto más selectivo será, por lo tanto, un fármaco mejor y más seguro.

El descubrimiento de subtipos ha sido, habitualmente, de tipo farmacológico, por la síntesis al azar de un compuesto selectivo que distingue los diferentes subtipos en los ensayos "in vitro" utilizados en el proyecto. Más recientemente, los subtipos se están descubriendo mediante la investigación de secuencias homólogas de la primera secuencia del receptor o enzima encontrada. Cuando se encuentran estas secuencias, el siguiente paso es determinar la distribución tisular de las proteínas que codifican y otras características que nos orienten sobre la función específica que pueden tener. En estos casos, el reto sigue siendo encontrar un compuesto selectivo para esa diana. La determinación de la estructura tridimensional y el modelado molecular pueden sugerir cómo producir un compuesto selectivo para ese determinado subtipo.

Actualmente, son comunes los ejemplos de proyectos selectivos para subtipos. El terazosin, un antagonista del receptor α_1 -adrenérgico, utilizado como agente antihipertensivo, también se ha utilizado para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna (HPB) cuando se descubrió que esta alteración era debida a una hiperactividad de este receptor. Sin embargo, el efecto antihipertensivo puede ser considerado como un efecto secundario cuando se utiliza para tratar la HPB. El efecto antihipertensivo se debe al subtipo del receptor α_1B , mientras que el efecto sobre la HPB se debe al subtipo α_1A . Por lo tanto, un compuesto específico para el subtipo α_1A , sería un fármaco mejor para el tratamiento de la HPB, y varios de ellos ya están en fases de desarrollo preclínico y clínico [11].

3. Genómica

Tradicionalmente, la identificación de dianas moleculares para el descubrimiento de fármacos era un proceso "de la función al gen." Una enzima o receptor interesante implicado en una enfermedad o función fisiológica, se aislaba y caracterizaba a partir normalmente de tejidos animales, hasta clonar el gen que lo codificaba. La expresión del mismo en un vector recombinante permitía confirmar su actividad, y utilizarlo para el cribado de compuestos, o para el diseño racional de nuevos fármacos. El proceso era lento, aunque daba lugar a dianas muy bien caracterizadas. La secuenciación masiva ha permitido el descubrimiento de nuevos genes, la mayoría sin función conocida, lo que ha llevado al descubrimiento de fármacos mediante un proceso "del gen al cribado" [12]. Uno de los descubrimientos que ha tenido una mayor incidencia en ese proceso ha sido el desarrollo que hicimos en nuestro laboratorio de los EST ("Expressed Sequence Tags") [13-15], basándonos en la construcción de clonotecas de ADN complementario (ADNc) de diferentes células y tejidos, en estados patológicos vs. normales, y activos vs. inactivos [16], seguido de la secuenciación masiva de este ADNc (figura 1). Un ejemplo prototípico de obtención de nuevos fármacos derivado de la genómica fue el de la catepsina K [12], un miembro de la familia de las proteasas de la cisteína que se descubrió analizando ESTs con una clonoteca de ADNc preparada a partir de osteoclastos. La investigación ulterior mostró que la inhibición de esta proteasa puede suponer un nuevo tratamiento para la osteoporosis [17].

Otros procedimientos para encontrar genes específicos o loci genómicos asociados con una enfermedad de interés es la definición de SNPs en humanos y ratón, o la utilización de "microarrays" para determinar la expresión de genes. Los "microarrays" de expresión génica también se utilizan para definir los mecanismos de acción de nuevos compuestos, o para estudiar la influencia directa de un agente en una ruta de señalización determinada, y su actividad.

La integración de la genómica en el proceso de descubrimiento de nuevos compuestos va a permitir avances considerables, aun a costa de cambios en la totalidad del proceso.

Con el conocimiento del Genoma Humano se prevé que el número de dianas potenciales pase de las 500 actuales a aproximadamente unas 10.000. Pero este incremento en el número de dianas, junto con el incremento de la información sobre las redes de señalización celular y su complejidad, va a obligar a mejorar las tecnologías, entre ellas la de cribado de alto rendimiento.

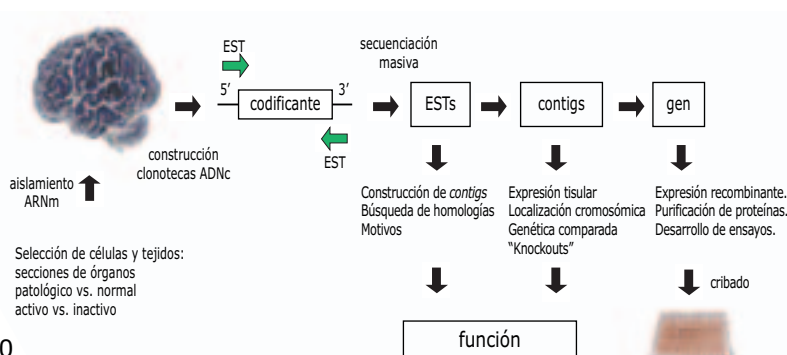


Figura 1. Ejemplo de proceso "del gen al cribado"

○ Validación de una diana

Cuando se ha descubierto una diana molecular potencial, hay que validarla o verificar su utilidad para el control de la enfermedad. Su utilidad puede estar cuestionada por varias razones. La primera, que el conocimiento de la ruta sea todavía rudimentario. Esto es especialmente cierto para los descubrimientos más recientes. Segundo, que la interacción de múltiples componentes en una ruta biológica compleja, como la señalización intracelular, sea tal, que la molécula elegida sea fácilmente sustituida por rutas alternativas en un organismo vivo, y resulte no ser esencial. Validar una diana no es una tarea fácil. Puede requerir una investigación intensiva, que puede que no sea asumible en el entorno económico de una compañía farmacéutica. Además, requiere la identificación de un inhibidor, agonista o antagonista, aún no existente y que sea suficientemente potente como ligando-sonda para poder comprobar cómo afecta al sistema ese compuesto.

Para acelerar el proceso de validación de dianas, se han desarrollado métodos, que en conjunto se conocen como genómica funcional. Entre estos métodos está la tecnología de "arrays," en la que una gran cantidad de oligonucleótidos representando secuencias de genes diferentes se inmovilizan sobre un soporte y se utilizan para identificar ADNc o ARN mensajero (ARNm) en determinadas muestras patológicas. Otras técnicas implican el bloqueo o eliminación de genes ("knocking out"), mediante métodos antisentido, interferencia de ARN (RNAi), y animales transgénicos, para ver el efecto que produce su pérdida; o la utilización de ribozimas marcadores que permiten la monitorización de las interacciones proteína-ácido nucleico o proteína-proteína, facilitando la rápida identificación de inhibidores para su uso en descubrimiento de fármacos [18].

○ Cómo conseguir compuestos cabezas de serie para el desarrollo de nuevos fármacos

La iniciación del proceso de descubrimiento de un fármaco dirigido a una diana, requiere el desarrollo de un ensayo primario *in vitro*. Para una enzima, en general se trata de un ensayo enzimático. Para un receptor, uno de unión al receptor. Al ensayo primario le suele seguir ensayos secundarios para confirmar la función de los compuestos, como el ensayo funcional que acompaña al ensayo de unión a receptor para distinguir agonistas de antagonistas.

Los ensayos se pueden dividir en dos clases básicas: ensayos funcionales y ensayos de afinidad [19]. Los ensayos funcionales comprenden distintas medidas de actividad, incluyendo ensayos enzimáticos, ensayos funcionales para receptores, ensayos celulares, de expresión génica, y muchos otros. Los métodos de detección incluyen densidad óptica, fluorescencia, radiactividad, etc. Los ensayos basados en fluorescencia tienen una relación señal-ruido alta respecto a la radiactividad, dando unos resultados de mayor calidad. El grado de éxito depende de los diferentes tipos de dianas. Los mejores resultados suelen conseguirse con inhibidores de enzimas, y con receptores que tienen lechos de unión definidos. Las peores ratios se obtienen cuando el compuesto debe interferir la interacción entre proteínas.

Los métodos de afinidad más comunes son la unión a receptores y la detección directa de la unión de ligandos. También se incluye la utilización de la propia proteína diana para seleccionar el compuesto de mayor afinidad a partir de una mezcla de numerosos compuestos combinados con la diana, denominado "selección por afinidad".

La elección del tipo de ensayo dependerá de la velocidad de análisis necesaria, típicamente de 10-30 compuestos por semana. El ensayo debe ser además, robusto, seguro y reproducible, dado que de sus resultados dependerá la decisión de síntesis de nuevos compuestos.

Una de las primeras aplicaciones de un ensayo en el desarrollo de un proyecto será la identificación de un compuesto cabeza de serie sobre el que realizar modificaciones para optimizarlo.

1. Posibles orígenes de compuestos cabeza de serie

1.1. Sustratos o ligandos naturales

El candidato más obvio para una diana de carácter enzimático será un análogo de su sustrato. El sustrato mismo rara vez es un buen cabeza de serie, porque es metabolizado rápidamente por la enzima y, por lo tanto, es lábil. Sin embargo, una simple modificación puede convertir al sustrato en un inhibidor. Esta modificación se ha utilizado, por ejemplo, para la inhibición del sistema renina en el caso de la hipertensión, o de la proteasa del HIV para el tratamiento del SIDA.

Con las enzimas que requieren cofactores como ATP, NADH, ácido tetrahidrofólico, S-adenosil-metionina, etc., se puede empezar con los cofactores mismos o con sus análogos. Tiene la desventaja de que muchas enzimas suelen utilizar el mismo cofactor, lo que, en principio, puede crear problemas de especificidad. Sin embargo, sus sitios de unión a las distintas proteínas suelen ser muy diferentes, por lo que puede conseguirse la adecuada especificidad.



Cuando la diana terapéutica es un receptor, la mayoría de los cuales se encuentran en la membrana, el ligando natural es el comienzo más razonable. Sin embargo, hay algunas características de estos ligandos que hay que tener en cuenta. Un ligando natural es típicamente un agonista. Si se desea un antagonista, hay que encontrar una modificación que convierta la función del compuesto en antagonista. Otro de los problemas de un ligando natural es que suele unirse con una afinidad similar a todos los subtipos del receptor. Cuando se quiere una especificidad para un subtipo determinado, hay que conseguir una modificación que dé esa especificidad. Finalmente, algunos de los ligandos naturales son proteínas, por ejemplo eritropoyetina o insulina, ambas utilizadas como fármacos; o péptidos, como la hormona liberadora de gonadotropina. Sin embargo, el fármaco deseado suele ser una molécula pequeña para conseguir una actividad por vía oral. El difícil proceso de reducción de un péptido o proteína natural a una pequeña molécula se denomina peptidomimética.

1.2. Compuestos previamente descritos

Los compuestos previamente descritos pueden ser un buen punto de partida cuando las series originales se abandonaron porque tenían algún problema que quedó sin resolver, o porque se han descubierto nuevos datos, tales como la especificidad de un subtipo, y se desean compuestos específicos. En ambos casos, hay que desarrollar una buena estrategia para apartarse de esas series y conseguir las características o especificidad deseadas. Además, hay que asegurarse de que las nuevas series no estén protegidas por las patentes sobre los compuestos publicados. Para que un compuesto pueda tener un desarrollo clínico y se pueda comercializar, es esencial que sea patentable.

1.3. Péptidos sintéticos, peptidomiméticos

Cuando un ligando cabeza de serie es un péptido natural o derivado de un péptido natural, suele ser deseable modificarlo para eliminar sus propiedades peptídicas. La razón es que los péptidos son muy lábiles "in vivo", y generalmente tienen una biodisponibilidad oral muy pobre. No obstante, en los últimos años el número de péptidos naturales y no naturales con aplicaciones farmacológicas ha aumentado considerablemente [20], y en algunos casos, su gran selectividad de acción y su actividad farmacológica han instado a la utilización de vías de administración alternativas a la vía oral. Un buen ejemplo es el Enfuvirtide o T-20, fármaco aprobado por la FDA en marzo 2003 para el tratamiento anti-HIV, que es un péptido lineal de 36 aminoácidos que inhibe la entrada del virus en la célula [21, 22].

La transformación de un péptido cabeza de serie en una pequeña molécula es un proceso que requiere un considerable esfuerzo, y que se denomina peptidomimética [23]. Se han descrito algunos resultados en el campo de los inhibidores de la proteasa del HIV, con una serie de compuestos activos por vía oral [24-26].

Aun considerando esta vía abierta, las moléculas más deseadas en el desarrollo de fármacos son todavía las orgánicas de bajo peso molecular. Dada la dificultad para crear un peptidomimético dirigido a una diana que se une a un péptido, en un periodo de tiempo y con un esfuerzo razonable, la mejor estrategia es cribar la diana con una quimioteca de pequeñas moléculas para identificar "hits" y proceder a su desarrollo por química médica, sorteando completamente el trabajo con péptidos.

1.4. Compuestos basados en la relación estructura-actividad

El método de análisis de la relación estructura-actividad (SAR) denominado "SAR por RNM", se basa en el perfil del espectro generado por resonancia nuclear magnética (RNM) por una proteína diana, que permite saber cuándo se le une un compuesto, y los residuos sobre los que ese compuesto se está uniendo. Con este método se puede detectar compuestos con uniones débiles del orden de los 1-10 mM [27], y permite el análisis de unos 10.000 compuestos muy pequeños que son realmente fragmentos de fármacos típicos. Si consideramos un caso en el que subgrupos de estos fragmentos pueden unirse potencialmente a cada uno de tres subsitios de un sitio activo de una diana, el cribado mediante SAR por RNM equivale a un cribado con una quimioteca virtual de todas las combinaciones posibles de los 10.000 fragmentos en cada uno de esos tres subsitios. Es decir, el equivalente a un cribado con una quimioteca tradicional de un billón de

compuestos. La potencia del método se basa en el hecho de que esos 10.000 compuestos se pueden analizar actualmente por RNM en mezclas de 10-50 compuestos, al mismo tiempo y en el plazo de varias semanas. Además, la RNM permite identificar no sólo el fragmento que se une, sino cerca de qué residuos se une ese fragmento. El método de SAR por RNM ya se ha utilizado para encontrar nuevos ligandos para diversas proteínas, como la proteína de unión a FK, papiloma virus E2, y estromelisin.

El hecho de que el SAR por RNM permita conocer no sólo qué fragmentos se unen a un sitio de interés, sino también información estructural respecto al lugar de la diana al que se unen, puede utilizarse para unir estos fragmentos químicamente entre ellos de forma racional. El resultado de la unión cooperativa de estos fragmentos da lugar a un gran incremento en la afinidad de unión. Por lo tanto, este es un método muy potente no sólo para encontrar un compuesto cabeza serie, sino para mejorar también la potencia del mismo gracias a la información estructural que ofrece.

1.5. Compuestos generados por química combinatoria

La síntesis combinatoria hace referencia a la síntesis de mezclas de compuestos, típicamente cientos de miles en un vial [28]. En general, la síntesis combinatoria se realiza sobre resinas sólidas. Por ejemplo, tres reactivos A, B y C se unen a resinas en tres viales separados. Las resinas se mezclan y se dividen en tres alícuotas. Cada una de las tres alícuotas se hacen reaccionar con tres nuevos reactivos D, E y F. De nuevo se mezclan las tres resinas y se separan en tres alícuotas, que se hacen reaccionar con tres nuevos reactivos G, H, e I. Los tres viales finales se mantienen separados, y cada uno de los cuales tiene nueve compuestos, hasta un total de 27. La ventaja de este proceso denominado "mezcla y divide" es que con 9 reacciones, se generan 27 compuestos distintos. Si se utilizan 50 reactivos en cada fase, con 150 reacciones tendríamos 125.000 compuestos, que es una tasa muy eficiente. Si elegimos diversos sustituyentes en cada fase, los compuestos resultantes serán bastante distintos, y además podemos generar un gran número de ellos. Sin embargo, este sistema no está exento de dificultades [29]. Primero, cribar mezclas de miles de compuestos en un vial es un reto extraordinario, para el que se han tenido que desarrollar nuevas tecnologías. Segundo, dadas las limitaciones en los tipos de química que son susceptibles de síntesis combinatoria, las restricciones de todos los compuestos en una quimioteca particular que tiene el mismo núcleo, y la necesidad de poner tres sustituyentes en cada fase para que el sistema sea eficiente, hace que los compuestos resultantes no sean tan diversos como sería deseable.

1.6. Química basada en síntesis múltiple/paralela

Si la síntesis combinatoria hace referencia a la síntesis de mezclas de compuestos, típicamente cientos de miles en un vial, cuando se sintetizan muchos compuestos de forma simultánea pero uno por vial, se denomina síntesis paralela. La síntesis paralela se está haciendo cada vez más común en el entorno industrial. Actualmente se pueden preparar 10-20 compuestos en el mismo tiempo que antes se necesitaba para sintetizar uno. Ello es posible gracias a la robótica y automatización, con una relativa reducción en la versatilidad química. Aunque hoy aún requiere a un grupo de químicos dedicados exclusivamente a ello, con el tiempo y el aumento de la robotización y automatización, la síntesis paralela podrá incorporarse a la rutina del químico médico.

Si la química médica sigue siendo el procedimiento principal para el descubrimiento de fármacos, aplicable a todas las fases del proceso, y el más versátil desde el punto de vista químico, es sin embargo, el que produce un menor número de compuestos. La síntesis paralela se sitúa en una zona intermedia, con la capacidad de aplicarse de forma rutinaria, pero sin poder aprovechar la química más compleja, lo que permite utilizarla en todas las fases del proceso excepto quizá en las últimas, en las que se requiere una química más sofisticada. Permite, sin embargo, sintetizar un mayor número de compuestos y por lo tanto, tiene una mayor eficiencia. El mayor número de compuestos puede hacerse con química combinatoria, pero requiere que la química utilizada sea simple, general, y susceptible de realizarse sobre resinas sólidas, lo que la limita a su utilización entre las primeras y las fases intermedias del proceso de descubrimiento de fármacos.



1.7. Química "in silico"

El descubrimiento de fármacos "in silico", o centrado en la informática, está basado en la integración y análisis de la información biológica (bioinformática) y química (quimioinformática), con el objetivo de acelerar y mejorar el descubrimiento de nuevos medicamentos. Estos experimentos "digitales" sobre información de secuencias, expresión, toxicología, y rutas y mecanismos, tienen el potencial para reducir el proceso secuencial limitante de los experimentos de laboratorio [30]. El mayor peso que han adquirido los experimentos "in silico" se debe al reconocimiento de que la distancia entre el gen y el fármaco es mayor de lo que pronosticaban los proponentes de la revolución genómica. Irónicamente, la genómica puede tener el mismo efecto que tuvo la química combinatoria, "ha aumentado el tamaño del pajar donde hay que encontrar la aguja". Otra de las razones de este mayor peso es que se ha alcanzado una masa crítica de información de alta calidad que hay que manejar, especialmente alimentada por el Proyecto Genoma Humano, e incrementada por la información derivada de la tecnología de "microarrays" sobre expresión génica. Y finalmente ha contribuido a esta mayor importancia de la experimentación "in silico", el desarrollo de programas analíticos fiables que además permiten la conectividad entre bases de datos heterogéneas.

2. Cribado

La técnica más común para encontrar compuestos cabezas de serie es el cribado [31]. Las características del cribado han evolucionado de forma sustancial durante las últimas décadas. Comenzó con el cribado de decenas a cientos de compuestos en modelos "in vivo". Después se desarrollaron ensayos "in vitro" para miles de moléculas en un periodo de tiempo que iba de 6 meses a un año. El trabajo básico de cribado se realiza en placas de microtitulación. Con la llegada de la tecnología de placas de 96 o de 384 pocillos, las mezclas de compuestos, la automatización, paralelización, y la robótica, se pueden cribar de forma rutinaria varios cientos de miles de compuestos en periodos de 3 a 6 meses. La metodología de cribado de alto rendimiento se ha traducido, por lo tanto, en el descubrimiento de un mayor número de compuestos activos ("hits"), más rápidamente, y para un mayor número de dianas. Se ha llegado a utilizar unidades de mayor capacidad (1.536 e incluso 3.456 pocillos), pero de forma menos frecuente por los problemas asociados con el manejo de volúmenes tan pequeños.

La capacidad para descubrir "hits" utilizando el cribado de alto rendimiento depende en gran medida de la calidad del ensayo de cribado. Transformar un ensayo rutinario en uno de alto rendimiento requiere un esfuerzo especial para hacerlo más robusto y conseguir que soporte condiciones más rigurosas en términos de relación ruido-señal. Además, debe estar cuidadosamente bien diseñado para poder detectar "hits" que efectivamente respondan a la diana molecular o al mecanismo de acción deseado.

El número y la calidad de los "hits" obtenidos dependen en gran medida de la naturaleza de la quimioteca utilizada para el cribado. Cuanto mayor sea la diversidad de los compuestos de la quimioteca, mejor. La mayoría de las quimiotecas de las compañías farmacéuticas son el resultado de la acumulación de compuestos de los proyectos específicos desarrollados internamente durante años, y por lo tanto, consisten en un grupo de compuestos bastante similares. La adquisición de compuestos a partir de otros proveedores comerciales o de instituciones académicas es una buena forma de enriquecer la quimioteca propia.

Tanto la síntesis combinatoria como la paralela, exigen la utilización rutinaria de medios informáticos para el manejo de los compuestos, un campo del cribado cuya automatización no se ha fortalecido suficientemente. La síntesis regular de 20-100 análogos a un tiempo, por ejemplo, obliga a seleccionar los sustituyentes adecuados para conseguir la diversidad adecuada, y otras características químicas, físicas o farmacofóricas. También obliga a recibir, identificar, ordenar, preparar y purificar cientos de materias primas. Además, hace necesario registrar cada síntesis, su pureza, las características de cada compuesto, y registrar los compuestos automáticamente en la quimioteca.

Pero los medios informáticos también se utilizan para realizar el cribado "in silico". Este cribado virtual nos permite eliminar aquellos compuestos con características no deseables para un fármaco potencial, antes de llegar al cribado primario. Por lo general estos procedimientos toman como punto de partida la estructura tridimensional de la proteína definida como diana farmacológica, o de alguna proteína homóloga que pueda ser utilizada para llevar a cabo el denominado modelado por homología. A continuación se puede seleccionar un determinado sitio de interés de la proteína, por ejemplo, el sitio de unión con otra proteína si se pretende identificar inhibidores de la interacción proteína/proteína. Este sitio de interés se define como diana para el cribado virtual de colecciones de compuestos. Para ello, se suelen utilizar programas potentes de 'docking' y durante el proceso, por lo general, se permite a las moléculas distintos modos de interacción con el sitio diana con objeto de identificar, no sólo las moléculas que mejor puedan ocupar dicho sitio, sino también su orientación. Por otro lado, también existen programas informáticos específicos para, una vez identificada una molécula virtualmente activa, proceder a la optimización de su orientación en la diana, proceso que genera una información de gran utilidad para posteriores etapas de síntesis de análogos de la molécula cabeza de serie. En un ejemplo reciente de la aplicación de estos métodos [32] se perseguía la identificación de inhibidores de la proteína antiapoptótica Bcl-2, que se modeló por homología a partir de la estructura de la proteína homóloga Bcl-xL. La base de datos inicial consistió en 194.000 moléculas. De éstas, 1.000 pasaron el primer cribado de interacción y orientación. Éstas se analizaron posteriormente de forma individualizada por métodos de modelado molecular y parámetros clásicos de química médica. Finalmente, se seleccionaron 28 que pasaron a ensayos "in vitro". Se identificó un cabeza de serie que inhibía Bcl-2 "in vitro" e inducía una marcada inhibición de la proliferación de células tumorales.



3. Verificación de un compuesto cabeza de serie auténtico

Cuando se identifica un "hit" mediante un cribado, hay que reconfirmar su actividad mediante ensayos "in vitro" primarios y secundarios. Si se confirma su actividad, la siguiente decisión es si se sigue su desarrollo mediante química médica. Esto depende de una serie de factores. El compuesto debe ser suficientemente potente, debe ser una molécula pequeña estable, y con un cierto número de sitios que puedan reemplazarse para permitir la síntesis de un análogo. Una vez comienza el proceso de química médica no todos los "hits" darán lugar a cabezas de serie productivos que merezca la pena perseguir. Cuando virtualmente cada cambio en la molécula lleva a la pérdida de la actividad, la serie debe abandonarse y hay que continuar con otro "hit". Es importante reconocer cuanto antes un "hit" no productivo y terminar con la serie para pasar a otro más útil. Una buena serie producirá, habitualmente, un incremento de potencia o actividad de 10 veces la original con los primeros 30-50 compuestos preparados, demostrando que se trata de un compuesto cabeza de serie auténtico, que tiene potencia, y que debe ser sometido a un programa completo de optimización por química médica.

○ Optimización de un compuesto

1. Química médica tradicional

Cuando se ha encontrado un "hit" adecuado, el siguiente paso es desarrollar la serie y optimizar los compuestos. En este proceso se tienen que sintetizar habitualmente miles de compuestos, durante un periodo de tiempo de 2-4 años, para conseguir uno o un pequeño número que tengan las características deseadas para llevarlo a ensayos clínicos y que se convierta en un fármaco. Estas características críticas son: potencia; estructura nueva y patentable; especificidad; estabilidad metabólica; actividad oral; buena absorción oral; formulación en una forma de dosificación sólida; buena farmacocinética; y ausencia de toxicidad. Tradicionalmente, esto se ha hecho mediante química médica. La química médica analiza cuidadosamente las estructuras químicas que se producen y los datos de actividad biológica obtenidos en ensayos primarios y secundarios, y utiliza las relaciones estructura-actividad que se deducen de estos análisis para decidir qué tipo de compuestos se sintetizaran luego. Este es un proceso lento y consecuentemente, uno de los mayores retos que existe actualmente en el descubrimiento de fármacos es la aceleración de la fase de optimización de compuestos.

2. Moléculas orgánicas diseñadas de novo basándose en la estructura tridimensional de la diana de interés

Un método que se está utilizando de forma muy extendida en la industria farmacéutica para acelerar el proceso de diseño de fármacos, es aquel que se basa en el conocimiento detallado de las interacciones y relaciones espaciales de los compuestos cabeza de serie con el sitio activo de la proteína diana [33]. Para ello hay que determinar la estructura tridimensional de la proteína diana, bien experimentalmente por cristalografía de rayos X, RNM, o mediante modelado por homología.

Los compuestos cabeza de serie se analizan en el sitio activo para ver cómo se unen. La naturaleza de los grupos que forman el sitio activo permite el diseño de nuevos compuestos que se sintetizan y analizan para ver su actividad biológica. Cuando se dispone de las nuevas estructuras, se puede analizar, mediante cristalografía o RNM, si los compuestos se unen como se había predicho. Basándose en esas estructuras, se diseña un nuevo grupo de compuestos, se sintetiza, analiza y examina estructuralmente, y el proceso continúa hasta que se encuentran los compuestos adecuados. Dado que se está produciendo de forma continua información de tipo estructural muy detallada, se pueden corregir los errores, y optimizar más rápidamente la verdadera relación estructura-actividad. Además, esta información estructural puede permitir el diseño de compuestos nuevos basándonos en la geometría y naturaleza de las interacciones que se pueden hacer con los grupos críticos del sitio de unión del ligando. Uno de los ejemplos más extendidos del diseño de fármacos basado en estructura es el de los inhibidores de la proteasa del HIV [24].

Por lo tanto, el diseño de fármacos basado en estructura puede utilizarse tanto para descubrir nuevos compuestos cabeza de serie, punto de partida significativo de nuevas series, como para diseñar series nuevas que son modificaciones de otras existentes, o para acelerar la optimización de un compuesto dentro de una serie.

○ Transformación de un compuesto biológicamente activo en un fármaco

El proceso de optimización de un compuesto comienza con la mejora de la potencia basada en ensayos "in vitro", típicamente la medida de la actividad enzimática o de la unión a receptor. Sin embargo, hay muchos otros factores que determinan la transformación de compuesto en un fármaco, como su actividad "in vivo", biodisponibilidad oral, farmacocinética y metabolismo, formulación, y toxicidad.

La actividad biológica en el animal de experimentación depende no sólo de la potencia intrínseca del compuesto, sino también de su biodisponibilidad a través de la ruta de administración seleccionada y de la farmacocinética del compuesto. Muchos fármacos terminan pronto en la fase de experimentación clínica debido a problemas de formulación, o farmacocinética o biodisponibilidad inadecuadas, dando lugar a un derroche innecesario de esfuerzo y de recursos. Por lo tanto, es esencial comenzar pronto a analizar estas características de una serie química, incluso antes de que la potencia intrínseca deseada aún no se haya conseguido. Para conseguir un fármaco de éxito, es preferible optimizar una segunda serie que sea menos potente pero que cumpla con las rigurosas exigencias farmacocinéticas y de biodisponibilidad.

Por otro lado, el coste de producción de un compuesto puede ser un factor crítico en la decisión de continuar con su desarrollo mediante ensayos clínicos, por lo que esta característica del compuesto debe quedar establecida tan pronto como haya que tomar la decisión de elegir un candidato para desarrollo clínico. El análisis de compuestos "in vivo" exige grandes cantidades del producto, en relación con los experimentos "in vitro". En cada estudio hay que preparar decenas a cientos de miligramos, debido a que para cada dosis hay que utilizar al menos tres animales, a veces más, y a menudo hay que hacer estudios de dosificación para determinar la dosis mínima efectiva, así como la dosis óptima eficaz. Algunos estudios pueden hacerse en breve tiempo, pero para algunas enfermedades, o para estudios de seguridad, pueden ser necesarios días o semanas de administración del producto. El número de animales a los que se les puede administrar el producto y estudiar, suele ser muy limitado.

Por todo ello, los estudios "in vivo" suelen ser caros y largos en el tiempo. Esto unido a que desde hace años hay una presión cada vez mayor para que se utilice el menor número de animales posible antes de comenzar las fases clínicas, hace necesario el descubrimiento de métodos nuevos que permitan reducir estas fases de experimentación "in vivo" al mínimo.

Si la integración de la genómica en el proceso de descubrimiento de nuevos compuestos va a permitir avances considerables, aun a costa de aumentar la complejidad del proceso, mucho más compleja será incluso la integración de la genómica en el desarrollo de esos compuestos hasta llegar al fármaco. Es improbable que los compuestos diseñados para modificar el comportamiento de una diana tengan el mismo efecto en todos los pacientes diagnosticados con la misma enfermedad, dado que ésta es el resultado de múltiples eventos secundarios, y en muchos casos, de más de un evento molecular inicial.

En consecuencia, el proceso tradicional de estudiar un grupo de pacientes amplio con el mismo diagnóstico, tendrá que sustituirse por el estudio de subgrupos de pacientes susceptibles de un tratamiento basado en una diana molecular particular. Y no sólo eso, los modelos "in vivo" e "in vitro" tradicionales tendrán que ser complementados o sustituidos por modelos genotípicos que permitan evaluar los efectos de la alteración de una diana particular en las distintas rutas y procesos fisiológicos y patofisiológicos en los que está implicada.

○ Otras estrategias terapéuticas



1. Anticuerpos monoclonales terapéuticos

Desde su descubrimiento a mediados de los 70, los anticuerpos monoclonales han supuesto una gran aportación al diagnóstico y la investigación biomédica [34]. En 1986 la FDA aprobó el primer monoclonal terapéutico OKT3, un anticuerpo frente al antígeno T3 de las células T humanas, utilizado para tratar el rechazo agudo de órganos trasplantados. Pero hubo que esperar a la humanización o quimerización de los anticuerpos murinos en los años 90, para que su aplicación como fármacos se extendiera a procesos como el cáncer de mama (Herceptin) o linfomas (Rituxan).

Actualmente, estos monoclonales, solos o en combinación con otros tratamientos, representan una fuente muy importante de nuevos ensayos clínicos. La mayoría de ellos se pueden agrupar en dos categorías. Una de ellas utiliza anticuerpos desnudos no-conjugados, en la que el efecto terapéutico es el resultado directo de su unión a superficies celulares para desencadenar apoptosis o muerte celular mediada por el sistema inmune. Entre los monoclonales humanizados no-conjugados están el Herceptin y el OKT3; los que se unen a la integrina vascular $\alpha_3\beta_1$ en los vasos tumorales; al factor de necrosis tumoral (infliximab); y a la proteína CD52 de los leucocitos (alemtuzumab).

Herceptin, por ejemplo, es un triunfo de la farmacogenética. La FDA autorizó su utilización frente al cáncer de mama en septiembre de 1998. Herceptin se une a la proteína producida por el gen del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER-2), también conocido como oncogen neu. HER-2 se sobreexpresa en el 25-30% de los cánceres de mama, los cuales son más agresivos, tienen mayor tasa de recurrencia, peor pronóstico, y aproximadamente una esperanza de vida que es la mitad que en las mujeres con cáncer de mama HER-2 negativo. Los ensayos clínicos han demostrado que el tratamiento con herceptin, sólo o combinado, da lugar una mayor supervivencia y en algunos casos a la remisión del cáncer en este grupo de pacientes.

Otro ejemplo de anticuerpo contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), de la familia de receptores tirosina quinasa tipo I o receptores ErbB, es el anticuerpo quimérico (hombre ratón) llamado cetuximab [35]. El cetuximab es un anticuerpo monoclonal que está en la fase más avanzada de desarrollo clínico (fase III), y tiene actividad en cáncer de cabeza, cuello y colon. El cetuximab se une al receptor EGFR con alta afinidad, compite con la unión del ligando y bloquea la activación del receptor tirosina quinasa por EGF o factor de crecimiento transformante alfa. Además, cetuximab induce la dimerización del receptor, resultando en la inhibición del mismo.

Como resultado de sus efectos sobre el receptor y señalización dependiente del mismo, cetuximab interfiere con un número de funciones celulares clave reguladas por el primero, lo que explica sus efectos antitumorales. Son efectos del cetuximab: 1) La parada del ciclo celular en la fase 1 debido a los altos niveles de p27 que da lugar a la hipofosforilación de la proteína Rb (retinoblastoma); 2) la potenciación de la apoptosis por inducción de Bax y activación de caspasa 8; 3) el bloqueo de la activación del EGFR que da lugar a un descenso en las células tumorales, de factores de crecimiento angiogénico (el factor de crecimiento fibroblástico básico, el factor de crecimiento endotelial vascular y la interleuquina-8); 4) la inhibición de la invasión de las células tumorales "in vitro" y la inhibición del crecimiento del tumor y metástasis, debido al efecto inhibitorio de cetuximab sobre la expresión y actividad de varias metaloproteasas de la matriz, que juegan un papel básico en los fenómenos de adhesión de las células del tumor; 5) la potenciación de los efectos antitumorales de la quimioterapia (cis-platino, doxorubicina, paclitaxel y topotecan) y de la radiación; y 6) la citotoxicidad celular contra las células tumorales por el sistema inmune dependiente de la presencia de cetuximab.

Dado que el modo de acción de los monoclonales es distinto al de los agentes quimioterápicos tradicionales, se están utilizando en terapias combinadas para que los efectos que los primeros ya han probado por sí solos, puedan incrementar de forma significativa el de los fármacos más tradicionales en el tratamiento del cáncer.

La otra categoría es la de los monoclonales que transportan compuestos citotóxicos o radioisótopos para destruir células "in situ" minimizando la exposición de las células sanas a dichos compuestos [36]. Entre estos ensayos se encuentra en fase I el Mylotarg (un inmunocóncugado con la toxina calicheamicina, dirigida contra el antígeno CD33 encontrado en células leucémicas) en pacientes con determinadas hemopatías malignas; y en fase II el SGN-15 (un inmunocóncugado anti-cBR96-doxorrubicina) en pacientes con cáncer de ovario. Entre los ensayos actuales de monoclonales utilizados para inmunoterapia radiactiva están los monoclonales cóncugados con I131 dirigidos contra la enascina en tumores cerebrales malignos, y los cóncugados con Yb90 frente a las células de cáncer de mama que expresan el antígeno B3.

En diciembre 2002, la FDA aprobó el adalimumab para el tratamiento de la artritis reumatoide moderada a severa [37]. El adalimumab, que se une específicamente al factor de necrosis tumoral α , es el primer anticuerpo totalmente humano (no quimérico) aprobado con una finalidad terapéutica, y podría representar el primer ejemplo de la sustitución de los anticuerpos quiméricos y humanizados utilizados hasta ahora.

Por lo tanto, los ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales están extendiéndose a otros procesos, además del cáncer, como el asma, lupus, esclerosis múltiple, psoriasis, artritis reumatoide, incluso frente a otras dianas como la toxina del carbunco (ABthrax). Pero además, el desarrollo de la farmacogenómica y la metabonomía, permitirá nuevas aplicaciones terapéuticas de los monoclonales contribuyendo a tratamientos mejores y más personalizados.

2. Interferencia terapéutica por ARN

La interferencia por ARN (RNAi) fue descubierta en 1998 como una potente inhibición de un gen diana producida por moléculas de ARN de doble cadena en *C. Elegans* [38], aunque no funcionaba en células de mamífero porque su sistema inmune destruía el ARN. El trimado de las moléculas a 21-23 nucleótidos permitió que estas moléculas de ARN de interferencia cortas (siRNA) sortearan el sistema inmune, funcionando también en las células de mamífero [39]. El potencial clínico de esta tecnología se puso de manifiesto cuando los siRNA pudieron detener la infección por HIV en cultivos celulares [40, 41]. Posteriormente se demostró que dosis masivas intravenosas de siRNA frente a Fas, que induce la apoptosis en hepatocitos cuando se sobreexpresa, protegían a éstos de los efectos de una hepatitis fulminante inducida químicamente en ratones [42]. Más recientemente se ha comprobado que los siRNA pueden inhibir la replicación del virus de la hepatitis C en cultivos celulares, y que la RNAi incluso podría tener un papel en las infecciones naturales, abriendo la posibilidad a su utilización terapéutica [43].

La idea de bloquear el ARN no es nueva. Durante más de 10 años se ha intentado silenciar el ARN con moléculas antisentido ("antisense"), moléculas de ADN de cadena simple modificadas químicamente, y diseñadas para unirse a las moléculas de ARNm relacionadas con una enfermedad, bloqueándolas. Sin embargo, la tecnología "antisense" ha tenido muchos problemas y sólo se ha aprobado un fármaco de este tipo por la FDA (Vitravene) para tratar infecciones oculares en pacientes con SIDA. En la mayoría de casos, los compuestos "antisense" se degradan rápidamente, por lo que su efecto es temporal y su potencia baja. Además, su eficacia parece arbitraria, y hay que determinarla basándose en prueba y error. Como los compuestos "antisense", el siRNA interfiere el ARNm, pero tiene importantes diferencias. Mientras los "antisense" son moléculas sintéticas, los siRNA existen de forma natural en muchas especies. En los experimentos de RNAi, se diseñan siRNA específicos para unirse al ARNm. Una vez se introducen en la célula son reconocidos por la maquinaria intracelular y se unen a determinadas proteínas formando complejos que desactivan miles de moléculas de ARNm específicas, lo que les da una gran ventaja sobre los "antisense" en términos de potencia.

Además de su posible utilidad terapéutica, la RNAi tendrá un efecto inmediato en genómica funcional [44]. Silenciar genes de forma rápida y simple puede servir para averiguar cómo un gen participa en un proceso celular, como una ruta de señalización, o nos puede permitir descubrir genes implicados en el desarrollo embrionario, o puede ayudar a dilucidar la función desconocida de nuevos genes. La RNAi es equivalente a los métodos de "knockout" de genes para identificar y validar dianas, pero no es tan costoso en términos económicos y de tiempo como es la utilización de animales transgénicos. Por ejemplo, con RNAi, un laboratorio académico de tamaño medio, no sólo puede hacer el "knockout" de 100 quinasas en un mes (algo imposible con ratones transgénicos), sino que puede silenciar varios genes simultáneamente. Esto es importante porque las enfermedades habitualmente implican a redes complejas de genes trabajando en tandem a través de una serie de rutas interconectadas. Recientemente se ha descrito el silenciamiento, por un solo equipo, de más de 2.700 dianas génicas por RNAi en tan sólo 16 meses, lo que da idea de la capacidad de este método [45].

La RNAi ha sido considerada el descubrimiento más importante de la década, quizá de las últimas décadas [46]. Sin embargo, a pesar de su potencial, el principal problema para que sea útil terapéuticamente es su vehiculización. Actualmente los siRNA se utilizan con lípidos catiónicos sobre cultivos celulares, pero no es aplicable al ser humano. Cuando se ha utilizado "in vivo", el volumen de las inyecciones en tres dosis equivalían a la mitad de la volemia del animal. La utilización de lentivirus que se está explorando tendría los mismos problemas que la terapia génica con retrovirus. Otro de los problemas actuales es el coste de su síntesis, que en el ser humano, representaría unos 1.000 € por inyección. En cualquier caso, la RNAi es una nueva área en biología que ya ha demostrado su valor en la validación de dianas moleculares.



○ Conclusión

Los descubrimientos en investigación básica dinamizados por el Proyecto Genoma Humano están revolucionando nuestra capacidad para determinar las bases moleculares de las enfermedades. Sin embargo, en muchos casos, estas bases son enormemente complejas y el resultado de la interacción de numerosas proteínas y factores biológicos. Las nuevas tecnologías que nos pueden ayudar en el manejo de tan vasta información, están teniendo un gran impacto en cada una de las fases del desarrollo de fármacos. Esto incluye la influencia de la genómica y de la genómica funcional en la identificación y validación de dianas moleculares, cribado de alto rendimiento para el descubrimiento de "hits", diseño de fármacos basado en estructura y química combinatoria para la optimización de compuestos cabeza de serie, y estrategias nuevas "in vivo" e "in vitro" para acelerar la optimización final y el análisis preclínico de los fármacos candidatos. Todas estas tecnologías ya han permitido una revolución en el tratamiento del SIDA, y serán la base de la próxima generación de nuevos medicamentos para grandes problemas de la humanidad como cáncer, diabetes, o enfermedades neurodegenerativas, de una forma eficaz y eficiente en el futuro más inmediato.

○ Bibliografía

1. Dreys, J.; et al.: *Receptor tyrosine kinases: the main targets for new anticancer therapy*. Curr Drug Targets, 2003. 4(2): p. 113-21.
2. Druker, B. J.: *Imatinib mesylate in the treatment of chronic myeloid leukaemia*. Expert Opin Pharmacother, 2003. 4(6): p. 963-71.
3. Druker, B. J.: *Imatinib and chronic myeloid leukemia: validating the promise of molecularly targeted therapy*. Eur J Cancer, 2002. 38(Suppl 5): p. S70-6.
4. Paramore, A. and Frantz, S.: *Bortezomib*. Nat Rev Drug Discov, 2003. 2(8): p. 611-2.
5. Pavlaki, M. and Zucker, S.: *Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPiS): the beginning of phase I or the termination of phase III clinical trials*. Cancer Metastasis Rev, 2003. 22(2-3): p. 177-203.
6. Giavazzi, R. and Nicoletti, M. I.: *Small molecules in anti-angiogenic therapy*. Curr Opin Investig Drugs, 2002. 3(3): p. 482-91.
7. Midgley, R. S. and Kerr, D. J.: *Ras as a target in cancer therapy*. Crit Rev Oncol Hematol, 2002. 44(2): p. 109-20.
8. Saretzki, G.: *Telomerase inhibition as cancer therapy*. Cancer Lett, 2003. 194(2): p. 209-19.
9. Shay, J. W. and Wright, W. E.: *Telomerase: a target for cancer therapeutics*. Cancer Cell, 2002. 2(4): p. 257-65.
10. Gulick, R. M.: *New antiretroviral drugs*. Clin Microbiol Infect, 2003. 9(3): p. 186-93.
11. Chess-Williams, R.: *The use of alpha-adrenoceptor antagonists in lower urinary tract disease*. Expert Opin Pharmacother, 2002. 3(2): p. 167-72.
12. Debouck, C. and Metcalf, B.: *The impact of genomics on drug discovery*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000. 40: p. 193-207.
13. Adams, M. D.; et al.: *Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project*. Science, 1991. 252(5013): p. 1651-6.
14. Adams, M. D.; et al.: *Sequence identification of 2,375 human brain genes*. Nature, 1992. 355(6361): p. 632-4.
15. Adams, M. D.; et al.: *Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence*. Nature, 1995. 377(6547 Suppl): p. 3-174.
16. Moreno-Palanques, R. F. and Fuldner, R. A.: *Construction of cDNA libraries, in Automated DNA Sequencing and Analysis*, C. Fields, M.D. Adams, and J.C. Venter, Editors. 1994, Academic Press: London. p. 102-109.
17. Zaidi, M.; et al.: *Cathepsin K, osteoclastic resorption, and osteoporosis therapy*. J Bone Miner Res, 2001. 16(10): p. 1747-9.
18. Gold, L., RNA as the catalyst for drug screening. Nat Biotechnol, 2002. 20(7): p. 671-.
19. Hill, D. C.: *Trends in development of high-throughput screening technologies for rapid discovery of novel drugs*. Curr Opin Drugs Disc Dev, 1998. 1: p. 92-7.
20. Latham, P. W.: *Therapeutic peptides revisited*. Nat Biotechnol, 1999. 17(8): p. 755-7.
21. Meanwell, N. A. and Kadow, J. F.: *Inhibitors of the entry of HIV into host cells*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2003. 6(4): p. 451-61.
22. Ferranti, S. and Menichetti, F.: *Enfuvirtide for prophylaxis against HIV Infection*. N Engl J Med, 2003. 349(8): p. 815.
23. Ripka, A. S. and Rich, D. H.: *Peptidomimetic design*. Curr Opin Chem Biol, 1998. 2(4): p. 441-52.
24. Wlodawer, A. and Vondrasek, J.: *Inhibitors of HIV-1 protease: a major success of structure-assisted drug design*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1998. 27: p. 249-84.
25. Lam, P. Y.; et al.: *Rational design of potent, bioavailable, nonpeptide cyclic ureas as HIV protease inhibitors*. Science, 1994. 263(5145): p. 380-4.
26. Abdel-Rahman, H. M.; et al.: *HIV protease inhibitors: peptidomimetic drugs and future perspectives*. Curr Med Chem, 2002. 9(21): p. 1905-22.
27. Shuker, S. B.; et al.: *Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR*. Science, 1996. 274(5292): p. 1531-4.
28. Gordon, E. M. and Kerwin, J. F.: *Combinatorial Chemistry and Molecular Diversity in Drug Discovery*. 1998, New York: John Wiley & Sons.



29. Geysen, H .M.; *et al.*: *Combinatorial compound libraries for drug discovery: an ongoing challenge*. Nat Rev Drug Discov, 2003. 2(3): p. 222-30.
30. Larvol, B. L. and Wilkerson, L. J.: *In silico drug discovery: tools for bridging the NCE gap*. Nat Biotechnol, 1998. 16(Suppl): p. 33-4.
31. Smith, A.: *Screening for drug discovery: the leading question*. Nature, 2002. 418(6896): p. 453-9.
32. Wang, J. L.; *et al.*: *Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(13): p. 7124-9.
33. Greer, J.; *et al.*: *Application of the three-dimensional structures of protein target molecules in structure-based drug design*. J Med Chem, 1994. 37(8): p. 1035-54.
34. Lesney, M. S.: *Monoclonal en masse*. Mod Drug Discovery, 2003. 6: p. 53.
35. Mendelsohn, J. and Baselga, J.: *Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer*. J Clin Oncol, 2003. 21(14): p. 2787-99.
36. Reff, M. E.; Hariharan, K. and Braslawsky, G.: *Future of monoclonal antibodies in the treatment of hematologic malignancies*. Cancer Control, 2002. 9(2): p. 152-66.
37. Bain, B. and Brazil, M.: *Adalimumab*. Nat Rev Drug Discov, 2003. 2(9): p. 693.
38. Fire, A.; *et al.*: *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. 391(6669): p. 806-11.
39. Garber, K.: *Silence of the genes: cancer epigenetics arrives*. J Natl Cancer Inst, 2002. 94(11): p. 793-5.
40. Novina, C. D.; *et al.*: *siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection*. Nat Med, 2002. 8(7): p. 681-6.
41. Jacque, J. M.; Triques, K. and Stevenson, M.: *Modulation of HIV-1 replication by RNA interference*. Nature, 2002. 418(6896): p. 435-8.
42. Song, E.; *et al.*: *RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis*. Nat Med, 2003. 9(3): p. 347-51.
43. Kapadia, S. B.; Brideau-Andersen, A. and Chisari, F. V.: *Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(4): p. 2014-8.
44. Dykxhoorn, D. M.; Novina, C. D. and Sharp, P. A.: *Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. 4(6): p. 457-67.
45. Winkler, H. and Powell, S.: *Targets*, 2003. 2: p. 42-44.
46. Schmidt, C. W.: *Therapeutic interference*. Mod Drug Discovery, 2003. 6: p. 37-42.

Capítulo IV:



Farmacogenética: Hacia una terapia personalizada más segura y eficiente

Autores:

Beatriz Tabarés Rodríguez

- Servicio de Farmacología Clínica. Hospital Universitario La Paz. Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.

Jesús Frías Iniesta

- Jefe de Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario La Paz. Profesor del departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid.

Farmacogenética: Hacia una terapia personalizada más segura y eficiente

○ Introducción

Uno de los principales problemas al que se enfrenta la Farmacología Clínica es la gran variabilidad interindividual que existe en la respuesta a los medicamentos. El desarrollo en las últimas décadas de la Biología Molecular y de sus técnicas, así como la profundización en el conocimiento del genoma humano han permitido el desarrollo de dos nuevas disciplinas dentro de la Farmacología capaces de abordar el problema mencionado: la Farmacogenética y la Farmacogenómica.

La Farmacogenética se ocupa del estudio de los factores genéticos que influyen en la variabilidad interindividual en la respuesta farmacológica, tanto en la eficacia como en la tolerancia. Aunque generalmente es un término utilizado para referirse al estudio de los genes relacionados con el metabolismo de los fármacos, en la actualidad se extiende también a todos los factores involucrados en su farmacocinética y farmacodinámica (receptores, transportadores, enzimas, canales iónicos...). El objetivo declarado de la farmacogenética es la individualización o personalización de los tratamientos. No se debe confundir la farmacogenética con terapia génica, ingeniería genética, manipulación genética, clonación o transgénicos.

La confluencia de la farmacogenética y de los rápidos avances en genómica humana ha dado como resultado a la Farmacogenómica, que se ocupa del estudio de la variabilidad individual en la expresión de los genes relevantes para las enfermedades así como de la respuesta farmacológica (1). Se encarga de comprender las bases genéticas de la enfermedad y así poder definir nuevas dianas terapéuticas y marcadores moleculares que evalúen la eficacia de nuevos fármacos. El objetivo final es conseguir nuevos y efectivos fármacos para las enfermedades comunes que carecen de tratamiento adecuado en la actualidad. Si bien en sentido estricto pueden distinguirse ambos conceptos, para muchos autores los términos son intercambiables.

Estas nuevas disciplinas han generado grandes expectativas médicas, sociales y financieras que deben plasmarse en los próximos años en nuevos medicamentos más específicos y cuya eficacia y tolerancia pueda determinarse a priori para cada paciente.

○ Historia de la farmacogenética

Puede decirse que la primera observación escrita relacionada con la farmacogenética se remonta, según algunos autores, al año 510 a.C., cuando Pitágoras observó que la ingesta de habas producía en algunos sujetos una reacción potencialmente fatal. Con el tiempo se reconoció que se trataba de una anemia hemolítica que aparecía en individuos con deficiencia en la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), siendo el primer informe de la farmacogenética moderna el publicado a principios de 1930 por Snyder sobre la incapacidad para saborear la feniltiourea, que presentaba una herencia autosómica recesiva.

Pero no fue hasta entrado los años 50 cuando la farmacogenética se estableció como campo de estudio, al tomar diversos investigadores en consideración que algunas reacciones adversas a medicamentos podían estar causadas por variaciones en la actividad enzimática genéticamente determinadas. Así se interpretaron los casos de hemólisis causadas por el antipalúdico primaquina en los soldados afro-americanos durante la II Guerra Mundial, que más tarde se asociaron con la deficiencia de la G6PDH (2).

Fue Motulsky en 1957 quien primero documentó el concepto de que los defectos heredados en el metabolismo de fármacos podían explicar las diferencias individuales en la respuesta a los medicamentos (3). Por ejemplo, la relajación muscular prolongada tras la administración de suxametonio fue explicada por una deficiencia congénita de una colinesterasa plasmática (4).

De la misma forma, los cambios heredados en la capacidad del paciente para acetilar la isoniácida –por la N-acetiltransferasa– (5) fueron considerados responsables de la neuropatía periférica ocasionada por este fármaco, así como de la distribución bimodal de las concentraciones plasmáticas de la isoniácida en sujetos con tasas genéticamente

determinadas de acetilación rápida o lenta. El que primero propuso el término "farmacogenética" fue Friedrich Vogel en 1959, y en 1962 Kalow escribió la primera monografía sobre el tema.

El campo de la farmacogenética fue estimulado en los años 70 cuando Vesell y sus colaboradores demostraron que las vidas medias plasmáticas de muchos fármacos eran menos divergentes entre parejas de gemelos monocigotos que entre parejas de gemelos dicigotos (6), concluyéndose con sus estudios que la herencia multifactorial podía determinar el metabolismo farmacológico individual (herencia multigénica). En el transcurso de los años posteriores, se fueron añadiendo ejemplos de respuestas exageradas, desconocidas, o ausencia de efectividad a fármacos como manifestación de patrones hereditarios individuales.

Más recientemente, han recibido mucha atención los polimorfismos genéticos comunes del metabolismo de fármacos como el de la debrisoquina/esparteína, mefenitoína, y el polimorfismo acetilador ya que afectan el metabolismo de numerosos fármacos clínicamente útiles y que involucran a una proporción de pacientes considerable.

Un hito en la farmacogenética fue la descripción que Robert Smith hizo en 1977 de la deficiencia en el metabolismo de la debrisoquina, cuando personalmente experimentó una importante hipotensión ortostática tras tomar el medicamento (7). Antes, en 1975, Eichelbaum presentó en una tesis que la deficiencia en el metabolismo de la esparteína ocasionaba náuseas, diplopía y visión borrosa (8); actualmente se conoce que ambos defectos son debidos a la deficiencia de la enzima Citocromo P450 2D6.

En el orden farmacodinámico se ha conocido muy recientemente que los receptores farmacológicos, como el beta 2-adrenoreceptor, o los transportadores farmacológicos, como el MDR1, responsable del gen de resistencia a fármacos, también están sujetos a variación genética.

Las bases genéticas moleculares de estos patrones hereditarios se han empezado a dilucidar a finales de los 80, con la clonación y caracterización de un gen humano polimórfico que codifica la enzima metabolizadora de fármacos debrisoquina hidroxilasa (CYP2D6) (9, 10), y ahora se ha extendido a numerosos genes humanos, incluyendo más de 20 enzimas metabolizadoras de fármacos, receptores y varios sistemas de transporte farmacológicos (Tabla 1).

GEN	FÁRMACOS	EFFECTO FARMACOLÓGICO LIGADO AL POLIMORFISMO
ENZIMAS METABOLIZADORAS DE FÁRMACOS		
CYP2D6	Betabloqueantes, antidepresivos, antipsicóticos, codeína, debrisoquina, dextrometorfan, encainida, flecainida, guanoxan, metoxiamfetamina, N-propilalajmalina, perhexilina, fenacetina, fenformina, propafenona, esparteína.	Disquinesia tardía con antipsicóticos; efectos secundarios narcóticos, eficacia y dependencia; requerimientos de dosis de imipramina; efecto de los betabloqueantes.
CYP2C9	Tolbutamida, warfarina, fenitoína, antiinflamatorios no esteroideos.	Efecto anticoagulante de la warfarina.
DIHIDROPIRIMIDINA-DH	Fluorouracilo.	Neurotoxicidad por Fluorouracilo.
TIOPURIN-METILTRANSFERASA	Mercaptopurina, tioguanina, azatioprina	Toxicidad y eficacia; riesgo de cáncer secundario.
CANALES DE POTASIO		
HERG	Quinidina. Cisaprida.	Inducción síndrome QT largo. Inducción Torsade de pointes.
KvLQT1	Terfenadina, disopiramida, mefloquina	Inducción síndrome QT largo
hKCN2	Claritromicina	Inducción arritmia

ECA= Enzima Convertidora de la Angiotensina.

Tabla 1. Ejemplos de polimorfismos genéticos clínicamente relevantes que influyen en el metabolismo de fármacos y en sus efectos. Una lista más completa se puede encontrar en <http://www.sciencemag.org/feature/data/1044449.shl> (11).

○ Principios de la farmacogenética

Hoy se estima que la genética es responsable de grandes diferencias en la respuesta farmacológica y que, en términos de disposición de fármacos, puede representar desde un 20 hasta un 95% de la variabilidad en la disposición y en el efecto de los medicamentos.

A pesar de que el efecto de un fármaco conlleva un fenotipo complejo que depende de muchos factores, ejemplos como los de la isoniacida y la succinilcolina facilitaron la aceptación del hecho de que la herencia podía tener una influencia importante en el efecto de un medicamento. De hecho, la farmacogenética tuvo su impacto inicial en la medicina a través del descubrimiento de reacciones farmacológicas inesperadas, en individuos y en familiares que revelaban la posible existencia de un patrón hereditario de las mismas (12, 13). El prototipo de dicho fenómeno lo representa el síndrome de anemia hemolítica inducida por fármacos en personas con deficiencia genética de la G6PDH en sus eritrocitos.

Hasta ahora la mayor parte de los estudios farmacogenéticos comenzaban con el reconocimiento de una gran variabilidad en la respuesta o en las concentraciones del fármaco en sangre o en orina entre los individuos de una población, seguido del entendimiento de que los rasgos bioquímicos que llevan a esta variación eran heredados, con la consiguiente búsqueda de los fundamentos genéticos de la misma. Es más tarde, cuando son identificadas las enzimas metabolizadoras del fármaco, los genes que codifican estas proteínas y la variación en la secuencia del DNA en estos genes, cuando se asocia con un rasgo hereditario.

Los objetivos de la investigación en farmacogenética son:

- LA IDENTIFICACIÓN DE VARIACIONES CONTROLADAS GENÉTICAMENTE RELACIONADAS CON LA FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA.
- EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES CAUSANTES DE ESTAS VARIACIONES.
- LA EVALUACIÓN DE SU SIGNIFICACIÓN CLÍNICA.
- EL DESARROLLO DE MÉTODOS SIMPLES DE ANÁLISIS DEL DNA GENÓMICO PARA IDENTIFICAR INDIVIDUOS QUE PUEDAN SER SUSCEPTIBLES A RESPUESTAS ANORMALES O INFRECÜENTES ANTES DE QUE LOS FÁRMACOS LES SEAN ADMINISTRADOS Y CONSEGUIR ASÍ MAYOR EFICACIA Y MENOR TOXICIDAD EN LOS TRATAMIENTOS.

Para conseguirlos, generalmente se siguen los siguientes pasos:

- SE ANALIZA LA DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN PARA LA VARIACIÓN EN ESTUDIO, UTILIZANDO UNA SONDA VÁLIDA PARA DETECTAR EL POLIMORFISMO FENOTÍPICO (QUE AFECTA A >1% DE LA POBLACIÓN),
- SE IDENTIFICA EL GEN RESPONSABLE Y SUS VARIANTES,
- SE REALIZAN ESTUDIOS FAMILIARES Y DE GEMELOS PARA CONFIRMAR SUS CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS (HERENCIA DOMINANTE, RECESIVA, MENDELIANA, MATERNA,...),
- SE DESARROLLAN ENSAYOS GENÉTICOS PARA LAS DISTINTAS VARIANTES DEL DNA,
- SE REALIZA LA CORRELACIÓN ENTRE EL GENOTIPO Y EL FENOTIPO Y POR FIN
- SE APLICA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA.

En el momento actual, la mayoría de los estudios farmacogenéticos están basados en correlacionar la respuesta del paciente con las variaciones en los genes involucrados en el mecanismo de acción del fármaco (por ejemplo, genes de receptores) o de su metabolismo (por ejemplo, genes de las enzimas del sistema citocromo P450) con el fin de determinar el "gen candidato".

La genética molecular y la genómica han transformado la farmacogenética en la última década. Los avances en la tecnología de secuenciación molecular, permiten además una investigación sistemática para encontrar variaciones funcionales significativas en las secuencias de DNA de los genes que influyen en los efectos de diversos fármacos, para después estudiar su repercusión fenotípica (14). Los dos alelos –versión específica de un gen– que porta un individuo en un locus –posición del alelo en el cromosoma–

forman parte del genotipo que puede ser fácilmente caracterizado a nivel del DNA. Su influencia en la cinética de un fármaco o sobre una función específica de un receptor, el fenotipo, puede ser medido por métodos analíticos avanzados para la detección de metabolitos o por sofisticadas investigaciones clínicas, como por ejemplo estudios de densidad de receptor por tomografía de emisión de positrones.

Gracias a la publicación de la secuencia completa del genoma humano, conocemos cuantos nucleótidos se necesitan para constituir los 23 pares de cromosomas, el número de genes que los constituyen, y el porcentaje de la secuencia genética no codificante. De este análisis se pueden destacar dos resultados: que el 99,9% de nuestros 3 billones de nucleótidos son idénticos en dos seres humanos cualesquiera, y que el restante 0,1% de la diversidad genética es la responsable de la mayoría de las diferencias que existen entre los individuos. Esta variación común se denomina polimorfismo definido como la coexistencia de genomas que muestran variaciones alélicas en la población. Las observaciones en la variabilidad de la respuesta farmacológica genéticamente determinada tienen que ver con polimorfismos en genes específicos.

Los polimorfismos genéticos pueden ser definidos cuando existen variaciones monogénicas en la población normal con una frecuencia mayor del 1% (15). El ámbito de estas variaciones es amplio e incluye polimorfismos de un único nucleótido (SNP, del inglés "single nucleotide polymorphism"), inserciones o deleciones que pueden incluir el gen completo, y repeticiones. La forma más común de todas es la variación en una sola base o SNP. Las características más importantes de los SNPs son su simplicidad, amplia distribución, estabilidad y alta frecuencia a lo largo del genoma (se estima que existen 7.5 SNPs por cada 10 kb nucleótidos), lo que hace de ellos unos marcadores genéticos ideales.

En la actualidad, el Consorcio SNP, grupo sin ánimo de lucro formado por compañías farmacéuticas, compañías procesadoras de información, instituciones académicas, y fundaciones de investigación, ha determinado un mapa de alta densidad con 4 millones de SNPs (<http://snp.cshl.org>). Cientos de miles de polimorfismos se pueden ahora identificar y ordenar de forma precisa dentro del mapa de alta densidad.

El análisis de los SNPs puede utilizarse como complemento a la determinación del gen candidato mediante la localización de las regiones cromosómicas en donde se encuentran los determinantes genéticos relevantes asociados a una enfermedad y de esta forma, correlacionar la información genética de un paciente con su probable respuesta a un medicamento, o a una reacción adversa rara y grave al mismo (Figura 1).

Los individuos portadores de un determinado alelo, probablemente son portadores de variantes específicas con varios marcadores de SNPs. Según esta aproximación, para predecir la respuesta a un medicamento no será necesario identificar los verdaderos genes y alelos implicados; sería suficiente con detectar los SNPs. Los avances tecnológicos asociados con la robótica y las reacciones múltiples reducirán significativamente el coste del análisis de varios cientos de miles de SNPs por paciente en los ensayos clínicos. Los programas bioinformáticos permitirán la rápida comparación de estos patrones de SNPs entre los pacientes que presenten diferencias fenotípicas en la respuesta a un fármaco. De tal manera que cuando la información de las diferencias en la respuesta farmacológica sea ostensible, los perfiles de los SNPs podrán ser relacionados con los actuales chips diagnósticos y así determinar o anticipar la respuesta a un fármaco por un paciente determinado (16).

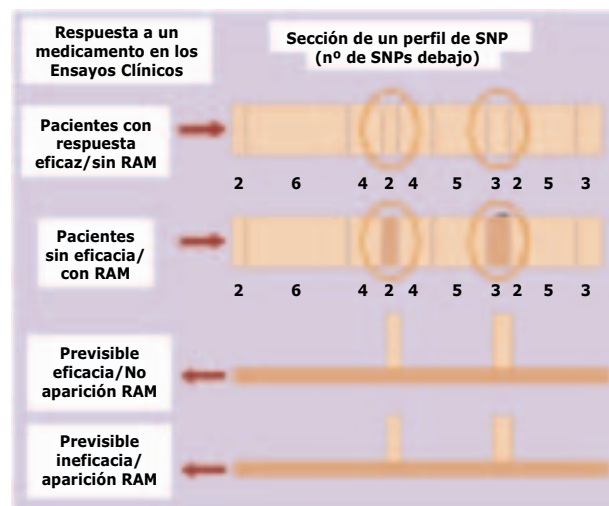


Figura 1. Representación esquemática de un perfil abreviado SNP-LD para predecir las respuestas de los pacientes a un medicamento. Gracias a este "perfil de respuesta farmacológica" se identifican a aquellos pacientes que presentarán eficacia y no presentarán RAM (16).

1. Variaciones en la respuesta farmacológica monogénicas y multigénicas

La mayoría de los rasgos farmacogenéticos que fueron identificados al principio eran polimorfismos genéticos que involucraban a un solo gen o monogénicos, donde hay una alta correlación entre la presencia del gen alterado y la presencia de la alteración. Una de las razones por las que la farmacogenética se centraba en los genes únicos es que eran fáciles de estudiar con las técnicas genéticas clásicas y que muchos de ellos eran clínicamente importantes. Algunos de estos polimorfismos genéticos que afectan a un nucleótido único ya se han asociado con cambios sustanciales en el metabolismo o en el efecto de los medicamentos, y algunos son ahora utilizados para predecir la respuesta clínica (17,18).

Sin embargo, la mayoría de las diferencias entre los individuos en su respuesta a los fármacos son multigénicas y multifactoriales. Esto es debido a que los efectos de los medicamentos están determinados por la interacción de varios productos genéticos que influyen en la farmacocinética y la farmacodinámica de los fármacos. La potencial naturaleza poligénica de la respuesta farmacológica se ilustra en la Figura 2, en la que se muestran los efectos hipotéticos de dos genes polimórficos, uno que determina la proporción de inactivación del fármaco y otro la sensibilidad del receptor al mismo.

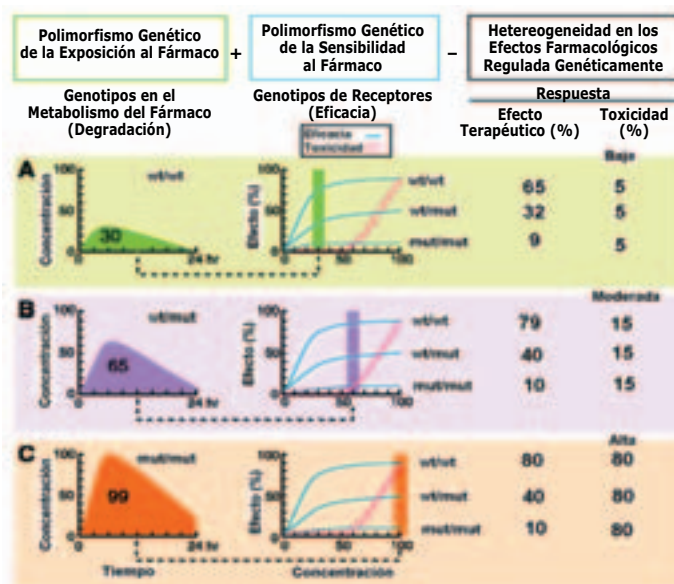


Figura 2. Determinantes poligénicos de la respuesta a los medicamentos. Se ilustran los efectos potenciales en individuos de dos polimorfismos genéticos, uno en la enzima metabolizadora del fármaco (izquierda) y el segundo en el receptor del mismo (en el centro), tras la administración de la misma dosis. En las gráficas de la izquierda se observan los diferentes aclaramientos (AUC o área bajo la curva de las concentraciones plasmáticas vs tiempo) y en la del medio la combinación de la primera y de la diferente sensibilidad del receptor en pacientes que son homocigotos para el alelo silvestre (wt/wt), heterocigotos con una variante alélica (wt/mut), o que tienen las dos variantes alélicas para los dos polimorfismos (mut/mut). En la tabla de la derecha se pueden observar el resultado de las nueve posibles combinaciones de los distintos polimorfismos entre el metabolismo y el receptor, dando un rango de índices terapéuticos (ratio eficacia: toxicidad) desde un favorable 13 en el paciente con genotipos wt/wt para el metabolismo y los receptores del fármaco (65%:5%) hasta 0,125 (10%:80%) en el paciente con genotipos mut/mut para el metabolismo y los receptores del fármaco (11,14).

2. Farmacogenética y poblaciones

La investigación farmacogenética más temprana examinaba las diferencias entre sujetos individuales, pero en su desarrollo, también se ha ocupado de las diferencias genéticas entre las poblaciones (19).

Este es otro aspecto importante de la farmacogenética, comprender que todas las variaciones farmacogenéticas estudiadas hasta hoy aparecen con diferentes frecuencias en las distintas subpoblaciones de diferentes orígenes raciales o étnicos. Por ejemplo, existen diferencias llamativas entre razas en la frecuencia de aparición de acetiladores lentos de isoniácida debido a las mutaciones de la N-acetiltransferasa 2 (NAT2) (de hecho, se sospechó el origen genético de esta deficiencia por la diferente frecuencia en la neuropatía inducida por la isoniácida observada en Japón frente a la observada en Estados Unidos de América. También existen diferencias raciales entre los metabolizadores pobres de la warfarina debido a mutaciones del CYP2C9, del omeprazol por los polimorfismos del CYP2C19, y los metabolizadores ultrarrápidos por duplicación de genes del CYP2D6 (10, 11, 20). Incluso algunas de las mutaciones de estos genes ocurren únicamente en ciertas subpoblaciones étnicas y trazan los orígenes y movimientos de las poblaciones en nuestro planeta. Esta diversidad étnica, también

llamada geografía del gen, farmacoantropología o etnofarmacología, implica que las diferencias poblacionales y el origen étnico tienen que ser considerados en los estudios farmacogenéticos y en la farmacoterapia.

○ Farmacogenética en la práctica clínica

1. "El fármaco correcto para el paciente indicado"

La experiencia en la práctica clínica nos revela que la administración de un mismo medicamento a diferentes pacientes a las dosis de prescripción "recomendadas" produce distintas respuestas: eficaz en la mayoría de ellos, sin efecto en otros, e incluso efectos tóxicos –incluso fatales– en un tercer grupo. Es relevante el hecho de que la mayoría de los tratamientos actualmente autorizados no son efectivos en todos los pacientes. Por ejemplo, el 20-40% de los pacientes con depresión presentan poca o nula respuesta al tratamiento antidepresivo, y porcentajes de pacientes similares o superiores son resistentes al efecto de antiasmáticos, antiulcerosos, o hipolipemiantes (21) (Tabla 2).



ENFERMEDAD	FÁRMACO	POBRES/NO RESPONDEDORES (%)
Asma	Agonistas Beta-2 adrenérgicos, 5-LO, LTD4	40-75
Cáncer (mama, pulmón, cerebro)	Varios	70-100
Depresión	Inhibidores de la Recaptación de Serotonina, Tricíclicos, MAOs	20-40
Diabetes	Sulfonilureas, biguanidas, glitazonas	50-75
Úlcera duodenal	Antagonistas H2, Inhibidores de la Bomba de Protones	20-70
Hiperlipidemia	HMGCoA reductasa, Resinas, Niacina	30-75
Hipertensión	Diuréticos tiazídicos, Betabloqueantes, Inhibidores ACE, todos los Antagonistas	10-70
Migraña	Triptanos, AINEs, ergotaminas	30-60
Osteoartritis/ Artritis reumatoide	AINEs, COX-2, antimetabolitos	20-50
Esquizofrenia	Dibenzodiazepinas tricíclicas, bencisoxazoles, butirofenonas	25-75

Tabla 2. Ejemplos de poco respondedores o no respondedores (eficacia) a la terapia farmacológica (21).

En cuanto a la importancia de los efectos tóxicos producidos por los fármacos podemos reseñar un metaanálisis de 39 estudios prospectivos realizados en hospitales norteamericanos que sugiere que el 6,7% de los pacientes hospitalizados presentan Reacciones Adversas a Medicamentos (RAMs) graves y el 0,32% fatales, causando estas últimas unas 100.000 muertes al año en EEUU. Sólo en el año 1994 en ese país se contabilizaron 2.216.000 pacientes hospitalizados con RAMs serias y 106.000 con RAMs fatales, situando a las RAMs entre la cuarta y sexta causa de muerte en EEUU (22). Los gastos ocasionados por las consecuencias de una terapia ineficaz y por los efectos adversos en EEUU se estiman entre 30 y más de 100 billones de dólares anuales (23). De estos datos se desprende la gran importancia de intentar mejorar la efectividad de los fármacos y de reducir o controlar sus efectos secundarios.

Aunque existen muchos factores no genéticos que influyen en los efectos farmacológicos (Tabla 3).

FISIOLÓGICOS	PATOFISIOLÓGICOS	GENÉTICOS	MEDIOAMBIENTALES
Edad	Función renal	Enzimas metabolizadoras de fármacos	Tratamientos concomitantes
Sexo	Función hepática	Transportadores de fármacos	Tabaco
Peso	Función cardiovascular	Canales iónicos	Alcohol
Grasa corporal	Enfermedades concomitantes	Dianas farmacológicas	Nutrición
		Vías de transducción de señales	Contaminantes

Tabla 3. Factores determinantes de la variabilidad individual en la respuesta a los fármacos.

Aunque existen muchos factores no genéticos que influyen en los efectos farmacológicos (Tabla 3), como son el medio ambiente, el estilo de vida (alimentación, consumo de alcohol y tabaco), la edad, el sexo, la función de los órganos, los tratamientos concomitantes, las interacciones farmacológicas, y la propia naturaleza de la enfermedad, existen en la actualidad numerosos ejemplos donde las diferencias interindividuales en la respuesta a medicamentos se deben a variaciones en la secuencia de los genes que codifican enzimas metabolizadoras de fármacos, transportadores de los mismos o dianas farmacológicas (11, 17, 18). Estos polimorfismos pueden tener o no una importancia clínica clara dependiendo de las bases moleculares del mismo, de la importancia relativa de la vía metabólica afectada sobre la eliminación global del fármaco, del índice terapéutico del mismo, de la expresión de otras enzimas metabolizadoras de fármacos en el paciente, la presencia de enfermedad o tratamientos concomitantes, y otros factores clínicos poligénicos que afectan a la respuesta farmacológica. A diferencia de otros factores que influyen en la respuesta a los fármacos, los determinantes hereditarios generalmente permanecen estables a lo largo de la vida del individuo.

La farmacogenética puede cambiar la forma de prescribir en la práctica clínica diaria. En vez de seguir el método actual de "ensayo y error", de manera que los pacientes prueban diferentes dosis de un mismo fármaco, y/o diferentes opciones terapéuticas, los ensayos farmacogenéticos pueden ayudar al clínico en la selección del fármaco y la dosis más apropiada para cada paciente en particular.

Las pruebas de genotipado y fenotipado para predecir los requerimientos de dosis están siendo introducidos cada vez más en el desarrollo preclínico de los medicamentos y en la rutina clínica, por ejemplo, para el elección y determinación de la dosis inicial de los antidepresivos (24). Además, los médicos tendrán disponibles perfiles farmacogenéticos (para seleccionar a aquellos pacientes que tengan una gran posibilidad de responder positivamente, y seleccionar aquellos que tengan bajo riesgo de presentar RAMs) específicos de respuesta a un fármaco concreto antes de que un medicamento sea prescrito. De esta forma se evitarán los retrasos en la administración de la terapia efectiva, los riesgos innecesarios de presentar reacciones adversas y los grandes gastos en tratamientos no efectivos. En la Tabla 4 se muestran algunos de los campos de desarrollo de la farmacogenética en la medicina actual.

ENFERMEDAD	FÁRMACO	POLIMORFISMO GENÉTICO	RESULTADO
Enfermedad de Alzheimer	Tacrina	APOE	Variaciones en la mejoría de las funciones cognitivas en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer con tacrina.
Esquizofrenia	Clozapina y otros neurolépticos	Receptor 5-HT _{2A}	Variación en la eficacia de estos fármacos en el tratamiento de la esquizofrenia.
Ateroesclerosis coronaria	Pravastatina	CETP	Variación en la eficacia de la pravastatina en el tratamiento de la aterosclerosis coronaria.
Úlcera gástrica o duodenal	Omeprazol y Amoxicilina	CYP2C19	Los metabolizadores lentos del CYP2C19 responden mejor a la terapia combinada que los metabolizadores rápidos.
Asma	Zileuton y Montelukast	Genotipo ALOX5	Respuesta reducida en heterocigotos.

APOE= Apolipoproteína E; 5-HT= 5-Hidroxitriptamina; CETP= cholesteryl ester transfer protein; LDL= lipoproteína lipasa; CYP= citocromo P-450; ALOX5= 5-Lipoxigenasa.

Tabla 4. Algunos de los campos de desarrollo de la Farmacogenética en la Medicina (25).

2. Factores hereditarios determinantes de la respuesta farmacológica

Tras la administración de un fármaco, entre los procesos que este sufre se encuentran su absorción, distribución hasta el lugar de acción, interacción con dianas (receptores y enzimas), metabolismo, y por último, su eliminación. Cada uno de estos procesos puede involucrar una variación genética.

3. Enzimas metabolizadoras de fármacos

El metabolismo suele producir metabolitos más hidrosolubles y más fáciles de excretar, pero también puede dar lugar a compuestos terapéuticamente activos a partir de profármacos, e incluso puede originar metabolitos tóxicos. Así, el polimorfismo que conlleva una disminución en la actividad de la enzima puede producir una gran toxicidad en fármacos con un estrecho índice terapéutico (mercaptopurina, azatioprina, tioguanina, y fluorouracilo) o una disminución en la eficacia de medicamentos que requieren ser metabolizados para ser activos (codeína).

Las reacciones metabólicas se clasifican en reacciones de fase I o sintéticas (por ejemplo, oxidación, reducción e hidrólisis), o de fase II, llamadas reacciones de conjugación (por ejemplo acetilación, glucuronización, sulfatación y metilación). En la actualidad podemos identificar variantes genéticas que codifican enzimas metabolizadoras de fármacos. Estas variantes hacen que podamos distinguir subgrupos en una población según su diferente capacidad para llevar a cabo estas reacciones de biotransformación. Los subgrupos con una deficiente capacidad para metabolizar cierto fármaco se denominan metabolizadores pobres o lentos o fenotipo PM (del inglés "poor metabolizers") en comparación con los metabolizadores "normales" o rápidos o fenotipo EM (del inglés "extensive metabolizers") y los metabolizadores ultrarrápidos o fenotipo UM (del inglés "ultra-rapid metabolizers").

4. Farmacogenética del metabolismo de fármacos: Reacciones de Fase I

Las enzimas más importantes que catalizan el metabolismo de fármacos de fase I son las pertenecientes a la superfamilia de enzimas citocromo P450 (CYP). Uno de los miembros de esta familia, el CYP2D6, representa uno de los ejemplos de variación farmacogenética en el metabolismo de fármacos mejor estudiado. Como se muestra en la Tabla 5, son muchos los fármacos metabolizados por esta enzima e incluyen aproximadamente el 25% de los fármacos que se prescriben habitualmente.

BETABLOQUEANTES	ANTIARRÍTMICOS	ANTIPSICÓTICOS	ANTIDEPRESIVOS	MISCELÁNEA
Carvedilol	Encainida	Haloperidol	Desipramina	Codeína
Metoprolol	Flecainida	Perfenacina	Fluoxetina	Lidocaína
Propanolol	Mexiletina	Risperidona	Nortriptilina	Tramadol
Timolol	Propafenona	Tioridacina	Venlafaxina	Tropisetron

Tabla 5. Sustratos seleccionados del CYP2D6 (<http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>).

El polimorfismo genético del CYP2D6 fue descubierto como resultado de las llamativas diferencias en la farmacocinética y en los efectos terapéuticos de fármacos metabolizados por esta enzima (26). En la Figura 3, donde se muestra la distribución de la tasa metabólica (MR) de debrisoquina en relación a su metabolito la 4-hidroxi-debrisoquina en orina de una población caucásica, se distinguen tres grupos de sujetos, los PM en el extremo derecho de la gráfica, separados por el punto de corte (MR=12.6) de los EM que se sitúan en el medio, y los metabolizadores ultrarrápidos (UM) en el extremo izquierdo de la distribución de frecuencias.

La debrisoquina, y la esparteína, representan "fármacos prueba (test)" -esto es compuestos que pueden utilizarse para clasificar a los sujetos como metabolizadores lentos, rápidos y ultrarrápidos. Esta estrategia de administración de un compuesto test metabolizado por una enzima genéticamente polimórfica, se ha convertido en una técnica estándar utilizada en muchos estudios farmacogenéticos. Sin embargo esta aproximación terapéutica no esta exenta de limitaciones, ya que, aunque es útil para propósitos de investigación, no es todavía fácilmente

adaptable para la rutina del laboratorio clínico. Actualmente se están desarrollando técnicas de alto rendimiento que pueden realizarse con el DNA aislado de una muestra de sangre, para su uso en el diagnóstico rutinario en los laboratorios clínicos. Una segunda limitación deriva de que la mayoría de los datos disponibles provienen de voluntarios sanos, en los que se han estudiado los polimorfismos tras la administración de bajas dosis únicas y sin medir eficacia, por lo que las consecuencias clínicas reales de estos polimorfismos aún no se conocen en su totalidad. Hay pues que esperar que estudios clínicos confirmen los beneficios de los ajustes de dosis en base a la capacidad metabólica, al igual que ya se hace, por ejemplo, de acuerdo al aclaramiento de creatinina en pacientes con insuficiencia renal.

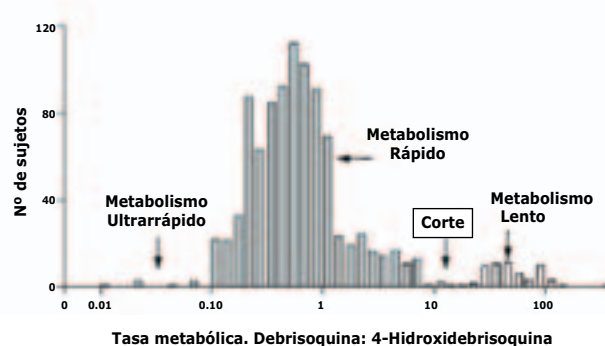


Figura 3. Farmacogenética del CYP2D6. Se muestran las tasas de metabolismo urinario de la debrisoquina a su metabolito, 4-hidroxi-debrisoquina, de 1011 individuos suecos. La caja "Corte" (MR=12.6) indica el punto de separación entre los sujetos con metabolismo lento, como resultado de una actividad disminuida o ausente del CYP2D6, y los sujetos con metabolismo rápido (27).

Aproximadamente de un 5 a un 10% de los caucásicos son PM para los sustratos del CYP2D6 (28,29), presentando concentraciones más bajas de metabolitos en orina y mayores en sangre de los fármacos originales que los metabolizadores rápidos (EM). Se demuestra además que en estos sujetos los fármacos tienen en general un efecto exagerado, y estudios familiares demuestran que la oxidación deficiente de la debrisoquina y la esparteína se heredan con un patrón autosómico recesivo (7,8). Entre los caucásicos hay un 2 a 3% de UM siendo estos sujetos portadores de duplicaciones e incluso múltiples copias del gen para el CYP2D6. Dichos sujetos pueden tener una respuesta terapéutica inadecuada con las dosis estándar de los fármacos metabolizados por el CYP2D6. Aunque la presencia de múltiples copias del gen CYP2D6 es relativamente infrecuente entre los europeos del norte, entre los españoles llega al 7% y en las poblaciones del este de África la frecuencia alélica puede alcanzar hasta el 29%. El efecto del número de copias del gen CYP2D6 –de 0 a 13– en la farmacocinética del antidepresivo nortriptilina se muestra en la Figura 4 (30). Esta gráfica ilustra muy bien cómo la genética puede influir en el metabolismo de un fármaco.

Desde un punto de vista experimental la aplicación de las técnicas de genética molecular han posibilitado el clonaje del DNA complementario (cDNA) y del gen codificante para el CYP2D6 (31), y ya se han descrito más de 75 alelos para el CYP2D6 (ver <http://www.imm.ki.se/cypalleles>). Entre las variantes genéticas responsables de bajos niveles de actividad o inactividad del CYP2D6, encontramos desde SNPs que alteran la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada, a SNPs que alteran el corte y empalme del RNA o incluso la delección del gen para el CYP2D6 (32). Los sujetos metabolizadores lentos o pobres (PM) heredan las dos copias del gen para el CYP2D6 que codifican una enzima con actividad disminuida o una de las copias sin actividad.

Conocer el genotipo del CYP2D6 puede ser importante tanto para ajustar la dosis del fármaco, como para seleccionar un medicamento para un paciente concreto, máxime cuando se sabe que las fichas técnicas de los medicamentos generalmente recomiendan dosis que se han obtenido de poblaciones genéticamente mixtas y no serán las óptimas para todos los subgrupos genéticamente definidos. En la práctica clínica se podrán utilizar tablas con recomendaciones específicas y cuantitativas de la dosis a administrar ajustada a los distintos genotipos de los CYP, (CYP 2C9, 2C19 y 2D6) basadas en el impacto que estos tienen sobre la disposición de una amplia variedad de fármacos (33). Como ejemplo podemos ver en la Tabla 6 unas recomendaciones de dosis específicas de genotipo para el CYP2D6 (34).

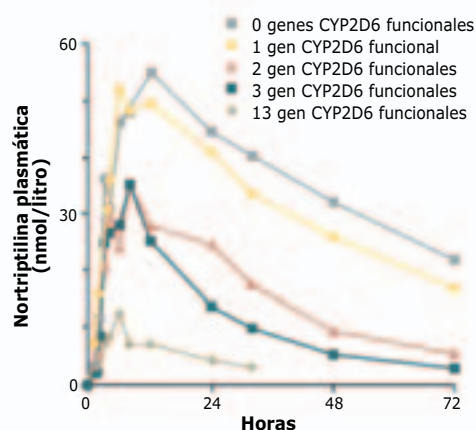


Figura 4. Farmacogenética de la Nortriptilina. Se muestran las concentraciones plasmáticas medias de la nortriptilina tras la administración oral de una dosis única de 25 mg. en sujetos con 0, 1, 2, 3, o 13 genes CYP2D6 funcionales (30).

FÁRMACO	DOSIS DE REFERENCIA ** (mg)	CYP2D6			
		PM	IM	EM	UM
Flecainida	200	80%	(90%)	110%	
Propafenona	450	40%	(80%)	130%	
Amitriptilina	150	50%*	(90%)*	120%	
Clomipramina	150	60%*	(90%)*	120%	
Tropisetron	10	30%	(80%)	130%	(150%)
Haloperidol	5	80%*	100%*	110%*	
Zuclopentixol	25	70%*	80%*	120%*	
Metoprolol	100	30%*	60%*	140%*	
Codeína	60	No recomendado	(110%)	(90%)	Dosis Baja

Tabla 6. Tabla de recomendaciones de ajuste de dosis de fármacos metabolizados por el CYP2D6 basadas en estudios publicados utilizando el análisis del genotipo o del fenotipo.

- Estos datos son preliminares y no son una recomendación médica para pacientes individuales. La dosis deberá ser ajustada en cada paciente por el médico considerando todos los parámetros relevantes. Ver (33).
*Recomendaciones basadas en datos en el equilibrio estacionario. () Recomendaciones que son estimaciones basadas en la analogía. ** La dosis de referencia es la dosis típica que ha sido utilizada como referencia para realizar los ajustes específicos de dosis dependientes de genotipo.

PM metabolizador lento; IM metabolizador intermedio; EM metabolizador rápido; UM metabolizador ultrarrápido (34).

Para ilustrar la importancia del genotipo en la selección de un fármaco podemos utilizar el ejemplo de la codeína: aproximadamente el 10% de la codeína administrada por vía oral es O-demetilada por el CYP2D6 a morfina, que es el compuesto activo analgésico principal de la codeína (35). No será pues recomendable administrar codeína como agente analgésico en aquellos pacientes que sean metabolizadores lentos para el CYP2D6, pues no producirán morfina suficiente, por el contrario, su administración puede ser peligrosa en metabolizadores ultrarrápidos, pues la rápida formación de morfina puede producir efectos adversos severos (36).

El polimorfismo del CYP2D6 representa un ejemplo excelente tanto de las potenciales implicaciones clínicas de la farmacogenética como del proceso por el cual la investigación farmacogenética condujo desde el fenotipo al entendimiento de los mecanismos moleculares a nivel del genotipo.

Aproximaciones similares se han ido aplicando después a otras isoformas del citocromo P450, incluyendo el 2C9, que metaboliza la warfarina, el losartán y la fenitoína; el 2C19, que metaboliza el omeprazol; y el 3A4-5, que metaboliza un gran número de fármacos (37-39). Ahora conocemos que otras muchas enzimas metabolizadoras de fase I presentan variación genética que puede influir en la respuesta de un sujeto a un fármaco. La Tabla 7 muestra ejemplos seleccionados de estas enzimas con variaciones farmacogenéticas clínicamente relevantes.

ENZIMA METABOLIZADORA	FRECUENCIA DEL FENOTIPO METABOLIZADOR LENTO	FÁRMACO METABOLIZADO REPRESENTATIVO	EFFECTO DEL POLIMORFISMO
CYP2D6	5-10% Caucásicos 1% Asiáticos	Debrisoquina Esparteína Nortriptilina Codeína	Aumento del efecto Aumento del efecto Aumento del efecto Disminución del efecto
CYP2C9	~3% Caucásicos	Warfarina Fenitoína	Aumento del efecto Aumento del efecto
CYP2C19	3-5% Caucásicos 15-20% Asiáticos	Omeprazol	Aumento del efecto
Dihidropirimidina Deshidrogenasa	~1% de la población son heterocigotos	5-FU	Aumento del efecto
Butirilcolinesterasa (Pseudocolinesterasa)	~1 en 3500 europeos	Succinilcolina	Aumento del efecto

CYP = Citocromo P-450; 5-FU = Fluorouracilo.

Tabla 7. Farmacogenética del Metabolismo de Fármacos: Reacciones de Fase I. Se muestran ejemplos de enzimas de fase I genéticamente polimórficas, junto con una selección de fármacos sobre los que presentan variaciones clínicamente relevantes en sus efectos (40).

Otro ejemplo en la farmacogenética del metabolismo de fármacos de fase I es el que involucra al agente antineoplásico fluorouracilo. A mediados de los años 80, se describió toxicidad fatal en el sistema nervioso central de varios pacientes tras el tratamiento con fluorouracilo a dosis estándar (41, 42). Los pacientes presentaban una deficiencia heredada de la dihidropirimidina dehidrogenasa (DPD), enzima que metaboliza el fluorouracilo y pirimidinas endógenas. Seguidamente, se describieron una serie de variantes alélicas para el gen que codifica esta enzima que conllevaban alta probabilidad de padecer efectos tóxicos con dosis estándar de fluorouracilo.

La farmacogenética de la DPD, y su efecto en el metabolismo del fluorouracilo, así como la de la tiopurina, sirven para ilustrar otro principio general: que la variación farmacogenética en la respuesta a los fármacos ha sido más frecuentemente observada en drogas con estrecho índice terapéutico –medicamentos para los que la diferencia entre la dosis tóxica y terapéutica es relativamente pequeña.

Las mismas estrategias en la investigación que han sido utilizadas para identificar variaciones genéticas en las reacciones comunes clínicamente significativas de fase I, se han aplicado en las reacciones de fase II.

5. Farmacogenética del metabolismo de fármacos: Reacciones de Fase II

La N-acetilación de la isoniácida (Figura 5) fue uno de los primeros ejemplos de variación heredada de las reacciones de fase II. El desarrollo de una neuropatía periférica asociada a isoniácida se puede presentar en pacientes acetiladores lentos del fármaco que son portadores de ciertos alelos del gen polimórfico para la enzima hepática N-acetiltransferasa 2.

Estos individuos presentan un riesgo aumentado de sufrir neuropatía periférica o daño hepático porque las concentraciones de isoniácida en su sangre se mantienen elevadas por más tiempo que en otros individuos con otros genotipos.

Estudios posteriores de clonación molecular demostraron que existen dos genes de la N-acetiltransferasa (NAT) en humanos, NAT1 y NAT2.

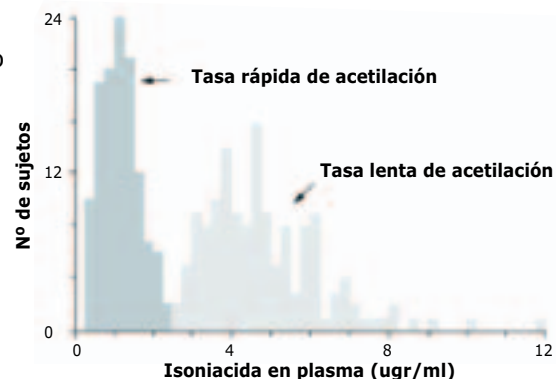


Figura 5. Farmacogenética de la Acetilación. Las concentraciones plasmáticas de isoniácida fueron medidas en 267 sujetos seis horas tras una dosis oral. La distribución bimodal en la tasa de acetilación se debe al polimorfismo genético en el gen de la N-acetiltransferasa 2 (5).

El polimorfismo genético común responsable de la variación farmacogenética del metabolismo de la isoniácida ilustrado en la figura involucra al gen NAT2. Este polimorfismo presenta una llamativa variación étnica (43), con el resultado de que la mayoría de los sujetos del este de Asia son acetiladores rápidos de la isoniácida y de otros medicamentos metabolizados por la NAT2.

Aunque el polimorfismo genético de la NAT2 fue uno de los primeros ejemplos descubiertos de variante farmacogenética en las enzimas de fase II, fue un polimorfismo genético común que implica otra enzima de la conjugación la que se ha convertido en uno de los primeros test farmacogenéticos clínicamente aceptados. Los fármacos tiopurínicos 6-mercaptopurina y azatioprina –un profármaco que pasa a mercaptopurina in vivo– son antimetabolitos de la purina utilizados en la clínica como inmunosupresores y para el tratamiento de neoplasias como la leucemia linfoblástica aguda infantil (44). Las tiopurinas son metabolizadas en parte por S-metilación catalizada por la enzima Tiopurina S-metiltransferasa (TPMT). La actividad de la TPMT está afectada por polimorfismo genético, teniendo el 89% de los caucásicos actividad elevada, el 11% son heterocigotos y presentan una actividad intermedia, y aproximadamente 1 de cada 300 caucásicos tienen una actividad muy baja de la TPMT. Se han descrito al menos 10 alelos diferentes de la TPMT asociados con actividad disminuida (45). Un paciente que tenga niveles de actividad bajos o que no tenga actividad de la TPMT (TPMTL/TPMTL) y que reciba dosis estándar de tiopurinas presentará concentraciones muy elevadas de nucleótido 6-tiogunina (6-TGN), bien correlacionados con eficacia terapéutica pero también con el riesgo de padecer mielosupresión (46), uno de los efectos secundarios más temidos de las tiopurinas y que puede llegar a ser letal.

Como resultado, el ensayo fenotípico del nivel de actividad de la TPMT en los glóbulos rojos y, seguidamente, los ensayos basados en el DNA, han sido los primeros ensayos farmacogenéticos utilizados en la práctica clínica. Son un buen ejemplo de la individualización del tratamiento en base a datos farmacogenéticos, recomendándose el ensayo de la TPMT previo a iniciar el tratamiento con estos fármacos tiopurínicos, especialmente si se van a administrar a dosis elevadas o por vía parenteral. Los pacientes con genotipo de baja actividad para la TPMT tendrán que ser tratados con dosis muy reducidas, si se quiere evitar la toxicidad (47) y en los pacientes con niveles muy altos de actividad, la eficacia de estos fármacos tiopurínicos estará disminuida a dosis habituales (48).

Otros ejemplos de variaciones farmacogenéticas en reacciones de fase II del metabolismo de fármacos se muestran en la Tabla 8.

ENZIMA METABOLIZADORA	FRECUENCIA DEL FENOTIPO METABOLIZADOR LENTO	FÁRMACO METABOLIZADO REPRESENTATIVO	EFEECTO DEL POLIMORFISMO
N-Acetiltransferasa 2	40-70% Caucásicos 10-30% Asiáticos	Isoniacida Hidralacina Procainamida	Aumento del efecto Aumento del efecto Aumento del efecto
Uridin difosfato-glucuronosiltransferasa 1A1 (polimorfismo TATA-box)	10,9% Blancos 4% China 1% Japón	Irinotecan Bilirrubina	Aumento del efecto Síndrome de Gilbert
Tiopurin S-metiltransferasa	0,3% Caucásicos 0,04% Asiáticos	Mercaptopurina Azatioprina	Aumento del efecto (toxicidad)
Catecol O-metiltransferasa	~25% Blancos	Levodopa	Aumento del efecto

Tabla 8. Farmacogenética del metabolismo de fármacos: Reacciones de fase II. Se muestran ejemplos de enzimas de fase II genéticamente polimórficas, junto con una selección de fármacos sobre los que presentan variaciones clínicamente relevantes en sus efectos (40).

6. Transportadores de fármacos

Las proteínas transportadoras tienen un importante papel en la regulación de la absorción, distribución y excreción de muchos medicamentos. Un determinante fundamental de la biodisponibilidad de un fármaco tras la administración oral es su capacidad para ser sustrato de la glicoproteína-P (gp-P). La gp-P es una proteína íntegra, perteneciente a la familia de transportadores de membrana adenosin trifosfato, que es codificada por el gen ABCB1 (también llamado MDR1 -Multidrug Resistance-). Básicamente actúa como una bomba de eflujo dependiente de energía. Este transportador se expresa en varios órganos (intestino, riñón, hígado) lo que sugiere que su función puede ser la excreción de xenobióticos y metabolitos a la orina, bilis y luz intestinal (49). Entre sus sustratos se encuentran la bilirrubina, varios agentes anticancerígenos, glicósidos cardíacos, agentes inmunosupresores, glucocorticoides, inhibidores de la proteasa del VIH, y otras muchas medicaciones (50, 51). En el intestino la función de la gp-P conlleva una disminución en la biodisponibilidad, al bombear los fármacos hacia el intestino. En el cerebro limita la acumulación de muchos fármacos (p.e. digoxina, vinblastina, dexametasona, ciclosporina, domperidona, y loperamida) constituyendo una parte importante de la barrera hematoencefálica.

En un estudio en voluntarios sanos se identificó un polimorfismo de la MDR-1 en el exon 26 ($C^{3435}T$) que se ha asociado con una expresión variable de la gp-P en el duodeno en pacientes homocigotos para el alelo T, donde la expresión fue menos de la mitad que en pacientes con el genotipo CC (52, 53).

Como se puede observar en la Figura 6, la digoxina, tiene una biodisponibilidad superior en sujetos con el genotipo 3435TT.

Como es típico de muchos rasgos farmacogenéticos existe una considerable variabilidad racial en la frecuencia del SNP $C^{3435}T$ (54). Alrededor de un 25% de la población caucásica estudiada es homocigota para el genotipo TT. Las mutaciones de este transportador pueden así influir no sólo en la dosificación de muchos fármacos, sino también en la concentración efectiva que se alcance en el compartimento del órgano diana. Además, su actividad no sólo está regulada genéticamente, sino que existe una amplia variedad de sustancias capaces de actuar como inhibidores o activadores de la gp-P (55), y parece tener implicaciones en las interacciones farmacológicas a nivel de transportadores.

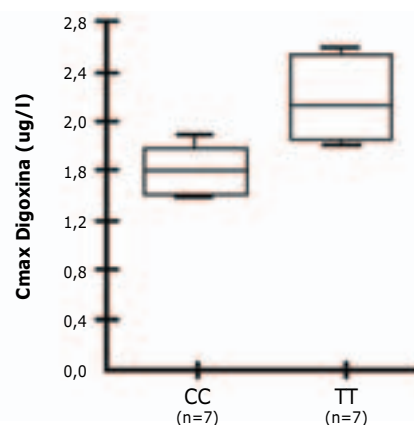


Figura 6. Impacto del polimorfismo del MDR-1 en la cinética de la digoxina. Se muestra la concentración máxima (Cmax) alcanzada de digoxina en función del genotipo del MDR-1 en el exon 26 $C^{3435}T$. Los Box plots muestran la media, el rango intercuartílico, y los intervalos de confianza al 95%. Los portadores del genotipo TT tienen una Cmax mayor en comparación con los portadores del genotipo CC ($p < 0.01$). Las concentraciones plasmáticas provienen de un estudio en voluntarios sanos tras la administración oral de 0,25 mg de digoxina en el equilibrio estacionario (52).

7. Farmacogenética de dianas farmacológicas

Los datos publicados sobre la farmacogenética de receptores y proteínas efectoras son escasos y tienen un origen reciente (a mediados de los años 90) si los comparamos con los del metabolismo de fármacos, debido a la dificultad de demostrar de forma precisa un fenotipo de respuesta farmacológico válido. Sin embargo en un corto periodo de tiempo, numerosos estudios han demostrado que los polimorfismos en las dianas farmacológica (receptores/efectores) contribuyen también a la variabilidad en la respuesta farmacológica (14). Las áreas mejor estudiadas en el momento actual en relación a la farmacogenética de los receptores/efectores farmacológicos son la psiquiatría, la neurología, el sistema cardiovascular y el asma. Ya se han identificado unos 25 ejemplos de variantes en la secuencia genética con un efecto directo sobre la respuesta a los

fármacos, algunos de los cuales se muestran en la Tabla 9, como el gen del receptor beta-2 adrenérgico, que afecta la respuesta de los beta-2 agonistas (56-59); de la araquidonato 5-lipooxigenasa (ALOX5), que modifica la respuesta a los inhibidores de la ALOX5 (60); y la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que afecta a los efectos renoprotectores de los IECAs (61).

GEN O PRODUCTO DEL GEN	FÁRMACO	RESPUESTA ASOCIADA AL POLIMORFISMO
ECA	Inhibidores de la ECA (Enalapril, lisinopril, captopril)	Efectos renoprotectores, índices cardíacos, reducción presión arterial, reducción masa ventricular izquierda
	Fluvastatina	Cambios lipídicos (reducción en la LDH y apolipoproteína B), progresión o regresión de la aterosclerosis coronaria
Araquidonato 5-lipooxigenasa	Inhibidores de leucotrienos	Mejoría del FEV ₁
Receptor beta-2 adrenérgico	Beta-2 Agonistas (p.e. albuterol, formoterol)	Broncodilatación, susceptibilidad a la desensibilización inducida por los agonistas, efectos cardiovasculares.
Receptor beta-2 de la bradiquinina	IECA	Tos inducida por IECA
Receptores de dopamina (D2, D3, D4)	Antipsicóticos (p.e. haloperidol, clozapina)	Respuesta antipsicótica (D2, D3, D4), disquinesia tardía inducida por antipsicóticos (D3), acatisia aguda inducida por antipsicóticos (D3)
Receptor estrogénico alfa	Estrógenos conjugados	Incremento de la densidad mineral ósea
	Terapia hormonal sustitutiva	Aumento del colesterol HDL
Glicoproteína IIIa subunidad de la glicoproteína IIb/IIIa	Aspirina o inhibidores de la glicoproteína IIb/IIIa	Efecto antiplaquetario
Transportador de la serotonina	Antidepresivos (p.e. clomipramina, fluoxetina, paroxetina)	Neurotransmisión de la 5-HT, respuesta antidepresiva

* Los ejemplos que se presentan son ilustrativos y no representan todos los estudios publicados. ECA = Enzima Convertidora de Angiotensina; IECA = Inhibidores de la ECA; FEV₁ =Flujo espiratorio forzado en 1 segundo; 5-HT = 5-hidroxitriptamina (serotonina).

Tabla 9. Polimorfismos genéticos en genes de dianas farmacológicas que pueden influir en la respuesta a los medicamentos (14)*.

Las diferencias genéticas pueden tener también un efecto indirecto sobre la respuesta farmacológica que no tiene que ver con el metabolismo o el transporte, como la metilación del promotor del gen de la metilguanina metiltransferasa, que afecta a la respuesta de los gliomas al tratamiento con carmustina (62). Sin embargo prácticamente no existen ejemplos con un nivel de evidencia tal que permita ser utilizado para la toma de decisiones en la aplicación de los tratamientos en la práctica clínica. Algunos autores señalan que las causas de esta situación son los datos ambiguos publicados y que los polimorfismos únicos contribuyen en un porcentaje muy escaso sobre la variabilidad de la respuesta global (63).

8. Polimorfismos genéticos con efectos indirectos sobre la respuesta farmacológica

Existen polimorfismos en genes que codifican proteínas que ni son dianas directas de fármacos ni están involucradas en su disposición pero que si producen una alteración en la respuesta al tratamiento en determinadas situaciones. En la Tabla 10 se muestran algunos ejemplos, como las diferencias hereditarias en los factores de la coagulación que pueden predisponer a las mujeres que toman anticonceptivos orales a padecer trombosis venosa profunda o trombosis cerebral (64), o los polimorfismos en el gen que codifica la proteína transferente del ester de colesterol que se han asociado a progresión de la aterosclerosis en el tratamiento con pravastatina (65).

GEN O PRODUCTO DEL GEN	ENFERMEDAD O RESPUESTA ASOCIADA	FÁRMACO	RESPUESTA ASOCIADA AL POLIMORFISMO
Apolipoproteína E	Progresión de la aterosclerosis, accidentes isquémicos cardiovasculares	Estatinas (p.e. simvastatina)	Aumento de la supervivencia
Apolipoproteína E	Enfermedad de Alzheimer	Tacrina	Mejoría clínica
HLA	Toxicidad	Abacavir	Reacción de hipersensibilidad
CETP	Progresión de aterosclerosis	Estatinas (p.e. pravastatina)	Enlentecimiento en la progresión de la aterosclerosis con pravastatina
Canales iónicos (HERG, kvLQT1, Mink, MiRP1)	Síndrome del QT largo congénito	Eritromicina, terfenadina, cisapride, claritromicina, quinidina	Incremento de riesgo de torsade de pointes inducido por fármacos
Metilguanina metiltransferasa (MGMT)	Glioma	Carmustina	Respuesta del glioma a la carmustina
Protrombina y Factor V	Trombosis venosa profunda y trombosis cerebral	Anticonceptivos orales	Aumento de riesgo de trombosis venosa profunda y trombosis cerebral con anticonceptivos orales
Parkin	Enfermedad de Parkinson	Levodopa	Mejoría clínica y disquinesias inducidas por levodopa

* Los ejemplos que se presentan son ilustrativos y no representan todos los estudios publicados. CETP= cholesteryl ester transfer protein.

Tabla 10. Polimorfismos genéticos en genes modificadores de enfermedad o modificadores del tratamiento que pueden influir en la respuesta a los medicamentos (14)*.

Las variaciones genéticas en los transportadores de iones celulares pueden tener también un papel indirecto en la predisposición de los pacientes a padecer efectos adversos. Por ejemplo, los pacientes portadores de variantes alélicas para los transportadores de sodio o potasio pueden presentar una morbilidad o mortalidad sustancial como resultado del síndrome del QT largo inducido por fármacos. El polimorfismo genético en el gen de la apolipoproteína E (APOE) parece poder predecir la respuesta al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y de los fármacos hipolipemiantes (66-68).

○ Farmacogenética en el desarrollo de fármacos. Eficacia y seguridad

“El medicamento ideal es aquel que trata o previene de forma efectiva la enfermedad y no produce efectos adversos” (16). Sin embargo, a pesar de estar muy regulado el proceso de investigación y registro de un nuevo medicamento, en la actualidad un fármaco comercializado raramente es eficaz y seguro en todos los pacientes. Hemos pasado del antiguo paradigma de la homogeneidad -todos somos iguales, un fármaco se ajusta a todo tipo de pacientes- al actual de la medicina personalizada. Hoy un programa típico de desarrollo de un fármaco generalmente se lleva a cabo bajo la premisa de que los pacientes son grupos homogéneos con una pequeña variabilidad interindividual. Sin embargo, no todos los pacientes responden a los mismos medicamentos de la misma manera. Parte de esta problemática podrá ser resuelta gracias a la aplicación de la farmacogenética y la farmacogenómica en el descubrimiento y desarrollo de fármacos.

Existen diferencias importantes entre el descubrimiento y el desarrollo de fármacos. El descubrimiento es un proceso que lleva consigo la investigación de los mecanismos de la enfermedad, la selección de dianas biológicas, y la identificación de compuestos que modulen la enfermedad. En este ámbito juega un papel primordial la farmacogenómica, a la que se dedica un capítulo aparte en este libro. En cambio, el desarrollo de fármacos está enfocado a establecer la eficacia y la seguridad de un compuesto dado a través de distintos ensayos clínicos hasta conseguir los conocimientos suficientes para conseguir la aprobación para su comercialización. Como resultado del avance en el conocimiento de la farmacogenética es probable que se produzcan cambios en la forma de desarrollar medicamentos.

La farmacogenética en el desarrollo preclínico de medicamentos puede contribuir a la selección de moléculas para continuar su investigación en fase clínica, puesto que al realizar estudios de metabolismo y de toxicogenética se puede priorizar la serie de moléculas en estudio en función del posible balance beneficio/riesgo seleccionando aquellas con menor probabilidad de sufrir metabolismo polimórfico o menor frecuencia de interacciones.

Los ensayos clínicos más tempranos, los fase I, tienen como objetivo establecer la tolerabilidad y la seguridad del compuesto (definir la dosis máxima tolerada, conocer la naturaleza de los efectos adversos,...) describir sus características farmacocinéticas (absorción, distribución, metabolismo y eliminación), establecer una pauta de dosis orientativa, estudiar las interacciones con alimentos u otros fármacos y avanzar en el estudio de características farmacodinámicas. Sin embargo, las conclusiones que se derivan de estos estudios, debido al reducido número de voluntarios que participan en ellos, dependen sobremanera de sus características individuales. Con frecuencia en esta fase se obtienen datos aberrantes que podrían quizás ser explicados gracias a la farmacogenética, como en los casos de diferente capacidad metabólica entre unos sujetos y otros debido al polimorfismo genético, distinta actividad de los transportadores del fármaco, etc.... Así en los primeros estudios en humanos, cuyo objetivo es obtener la máxima información con la exposición del mínimo número de sujetos, el conocer el genotipo de los sujetos para las enzimas que metabolizan el fármaco en desarrollo puede ayudar a explicar la variabilidad interindividual en la farmacocinética, en los efectos adversos y en la farmacodinamia. Se obtendría también información previa para los diseños de pautas ascendentes en la búsqueda de la dosis máxima tolerada (conoceríamos de antemano qué individuos son metabolizadores rápidos, lentos o ultrarrápidos), y se podría así aumentar la dosis de forma más o menos escalonada. También se podría iniciar la búsqueda de genotipos o subgrupos de población que se asocien a efectos adversos.

La variabilidad en el genotipo metabolizador de la población de voluntarios sanos que participan en distintas unidades de ensayos clínicos puede tener un impacto significativo en los ensayos de fase I, ya que los resultados pueden no ser comparables dependiendo del porcentaje de metabolizadores lentos que existan en cada estudio o en las distintas áreas geográficas que participen en el desarrollo del medicamento. Es por ello importante genotipar a los voluntarios de forma prospectiva. También sería de interés estratificar a los voluntarios participantes en los ensayos de fase I de acuerdo al genotipo de la glicoproteína-P, para así minimizar la variabilidad farmacocinética, pues como hemos visto antes, este transportador se expresa en muchos tejidos y sus mutaciones pueden influir en la biodisponibilidad de los medicamentos.

Las autoridades reguladoras de la investigación y desarrollo de medicamentos son tan conscientes de lo anteriormente mencionado que la Agencia Europea del Medicamento (EMA, European Medicinal Evaluation Agency) ha publicado a través de su órgano competente, el CPMP (Committee on Proprietary Medicinal Products), una serie de directrices haciendo referencia a la necesidad de evaluar factores genéticos durante el desarrollo de nuevos medicamentos. Así, se requiere que los estudios metabólicos realizados indiquen si el metabolismo del fármaco puede ser modificado sustancialmente en pacientes con deficiencia de una enzima genética, o si puede ocurrir saturación del metabolismo y cinética no lineal en los rangos de dosis utilizados habitualmente (CPMP - Guidelines on Pharmacokinetic studies in man). En otra recomendación se indica claramente que los sujetos que participan en los estudios de interacción in vivo deben ser adecuadamente genotipados y fenotipados si alguna de las enzimas implicadas en su metabolismo se distribuyen de forma polimórfica en la población (CPMP - Note for guidance on the investigation of drug interactions 1997). En otra directriz se señala que el

fenotipo y/o genotipo de los participantes se debe considerar en todos los estudios exploratorios de biodisponibilidad y en todos los estudios con un diseño paralelo. También se debe considerar en los estudios cruzados por razones de seguridad o farmacocinética. Por último, en la recomendación que se refiere a estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia, por ejemplo, para el estudio de formulaciones con medicamentos genéricos, se señala que si se sabe que un fármaco está sujeto a un polimorfismo genético mayor, los estudios pueden realizarse en subgrupos de sujetos con un fenotipo o genotipo conocido para el polimorfismo en cuestión [CPMP - Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence (2001)].

También otras autoridades han regulado estos aspectos, y la Conferencia Internacional para la armonización sobre requerimiento de datos para el desarrollo de medicamentos (ICH, International Conference on Harmonization) ha hecho recomendaciones expresas en similar sentido que la EMEA en diversos documentos [ICH - Dose response information (1994), ICH - Ethnic factors in the acceptability of foreign clinical data (1998)].

Los ensayos en fase II y III tienen como objetivo definir la actividad terapéutica del medicamento y establecer mediante estudios comparativos sus indicaciones en una determinada patología. Todavía no hay directrices para la realización de estudios farmacogenéticos en estas fases del desarrollo de fármacos, pero es obvio que el progresivo conocimiento de la variabilidad en la respuesta de causa farmacogenética va a influir significativamente.

No está claro si influirá en el número de pacientes a estudiar, pero parecería que la necesidad de estudiar poblaciones con polimorfismos conocidos de las enzimas metabolizadoras del fármaco para encontrar los marcadores de polimorfismo que puedan predecir la respuesta supondría una necesidad de aumentar el número de enfermos en estudio. A cambio, parece claro que la farmacogenética puede elevar el balance riesgo/beneficio para muchas medicinas, gracias a una mejor estratificación de los pacientes según sean sus marcadores, perfiles de respuesta y riesgo de padecer una RAM. Así, un análisis retrospectivo de estos perfiles de respuesta y marcadores de toxicidad de los pacientes incluidos en la fase II puede ayudar a seleccionar a los pacientes que se deben incluir en la fase III de manera que sean necesarios un menor número de pacientes. Después, en los ensayos en fase III se podría utilizar el genotipo prospectivamente como criterio de selección, al igual que se eligen normalmente poblaciones homogéneas en base a sexo, edad y otros factores, para seleccionar subpoblaciones en las que la eficacia fuera superior, excluyendo a aquellos pacientes que responden a placebo o no susceptibles a la enfermedad y a aquellos con riesgo de toxicidad grave (Figura 4).

Alternativamente el mapa de SNPs del genoma humano puede que evite la necesidad de evaluar el fármaco en pacientes con polimorfismos ya conocidos. Otra posibilidad puede ser genotipar a los pacientes que son retirados del estudio por falta de eficacia o por efectos adversos.

En cuanto a la evaluación de la seguridad, el problema radica en que a pesar del gran número de individuos que típicamente entran en los ensayos clínicos para evaluar la eficacia y seguridad de nuevos fármacos, las RAMs raras (menos de 1 en 1.000) tienden a identificarse sólo cuando el medicamento ha sido utilizado en una población de pacientes mucho más extensa, por ejemplo en la fase inicial de comercialización, de ahí que un desarrollo dirigido podrá evitar problemas en subgrupos de pacientes y anticipar la toma de decisiones.

En todo caso, es importante tener expectativas realistas sobre la información que la farmacogenética puede aportar. Hay quien piensa que la farmacogenética va a cambiar radicalmente el proceso de desarrollo de medicamentos, acortando el tiempo medio de desarrollo de un fármaco, que hoy se estima entre 10 a 15 años, disminuyendo el número total de pacientes estudiados antes de la comercialización y abaratando los costes. Mientras que otros autores estiman que la farmacogenética va a permitir el desarrollo de fármacos más específicos para subgrupos de población, y con ello se conseguirá un uso más seguro, aunque los fármacos serán más caros al ser dirigidos a una menor población, la que tiene un genotipo concreto, pero que serán bien aceptados por la sociedad por su alto valor intrínseco.



En cuanto a su uso como herramienta clínica también hay posturas divergentes, desde quienes piensan que la utilización de la farmacogenética será muy útil porque permitirá tratar solamente a los pacientes que se sabe que van a responder favorablemente, sin exponer a los no respondedores ni a los que pueden tener efectos adversos, hasta quienes señalan que el análisis de un grupo amplio de marcadores genéticos sólo puede mostrar que un subgrupo genotípicamente definido de pacientes con una cierta enfermedad puede tener una mayor probabilidad de responder de una cierta manera a un cierto fármaco, pero nada más. A este respecto, hay quien compara los análisis farmacogenéticos con la valoración de la tensión arterial o los niveles plasmáticos de lípidos, considerándolos otros indicadores o factores de riesgo de enfermedad.

En todo caso, cabe pensar que los avances en el Genoma Humano y su aplicación a la farmacogenómica y la farmacogenética representan una clara oportunidad para mejorar la eficiencia del proceso de desarrollo de fármacos, y también para racionalizar la gestión del tratamiento de las enfermedades en lo que se ha denominado “medicina personalizada”: el fármaco correcto, a la dosis correcta para el paciente indicado. La aplicación de la farmacogenómica se prevé que permitirá desarrollar nuevos fármacos en un periodo de 6 a 12 años. Por el contrario, la aplicación de la farmacogenética en la racionalización y personalización de los tratamientos es ya una realidad que se consolidará en los próximos 5 años.

○ Epílogo

La farmacogenética continúa siendo una disciplina médica joven. Muchos aspectos teóricos y prácticos siguen requiriendo su clarificación antes de que se alcance su completo desarrollo y máximo beneficio. Sin embargo, durante los últimos años se han producido avances sin precedentes en nuestro conocimiento sobre la importancia del polimorfismo genético en la determinación de la susceptibilidad personal a desarrollar diversas enfermedades y en el grado de eficacia y tolerancia de los medicamentos utilizados en diversas áreas terapéuticas.

El desarrollo de la farmacogenética puede contribuir a mejorar nuestra capacidad de manejar las enfermedades y la calidad de vida de los pacientes. También se espera que haciendo disminuir las reacciones adversas y los tratamientos innecesarios antes de que sean prescritos, se podrán alcanzar grandes ventajas en términos de coste-efectividad.

Con la finalización del Proyecto Genoma Humano, se acerca el momento en que conoceremos las secuencias de prácticamente todos los genes que codifican enzimas metabolizadoras de fármacos. A medida que nuestro conocimiento sobre variaciones genéticas de proteínas involucradas en la absorción, distribución, metabolismo y acción de varios medicamentos se incrementa, también aumenta nuestra capacidad para examinar esa variación y como resultado, para seleccionar el mejor fármaco a la dosis óptima para cada paciente (40). Lo mismo será aplicable para los genes que codifican transportadores, receptores y otras dianas de los fármacos.

No obstante existen algunas sombras en el camino, la práctica de la farmacogenética es un reto para la industria farmacéutica, las autoridades reguladoras, la comunidad médica, los pacientes y la sociedad como un conjunto, con nuevas preguntas y temas. Se espera que la farmacogenética tenga un amplio impacto no sólo sobre el desarrollo de fármacos y el proceso regulatorio de aprobación para su uso, sino también sobre cómo se prescriben y administran los medicamentos a los pacientes, y existen, por qué no decirlo, consideraciones éticas que afectan a pacientes, médicos y sociedad que deberán estudiarse con detenimiento a medida que los conocimientos farmacogenéticos y sus consecuencias vayan cambiando los hábitos médicos.

También es cierto que necesitarán dar varios pasos antes de que la farmacogenética se integre en la práctica clínica diaria. Primero se deberán investigar a fondo los ajustes de dosis basados en el genotipo. Segundo, la aplicación de estos ajustes de dosis deberán ser investigados en ensayos clínicos prospectivos. En estos ensayos, se deberán establecer criterios clínicos de evaluación relevantes para verificar el valor del genotipado antes de ser introducido en la práctica clínica. Tras dar estos pasos satisfactoriamente, el genotipado farmacogenético podrá ser algo rutinario en la práctica clínica, y quizás llegue un día en que se pueda realizar en todos los pacientes un pasaporte genético que registrará los genotipos relevantes, y que permita seleccionar el fármaco adecuado a su dosis óptima de acuerdo al diagnóstico del paciente, sus características y su pasaporte genético específico siendo la medicina del futuro dirigida hacia la prevención y la individualización (34). Para ello será necesario además que se desarrollen análisis genotípicos rápidos y con bajos costes. Cuando esto ocurra, podremos pasar de la estrategia actual de "un fármaco a una dosis para una enfermedad" a una más individualizada.

Por último tampoco hay que olvidar que es el fenotipo el que determina la respuesta farmacológica, y que este fenotipo es el resultado de unas complejas interacciones entre los genes y el ambiente, y no sólo resultado de los genes.



○ Bibliografía

1. EMEA/CPMP/3070. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: position paper on terminology in pharmacogenetics 2001; <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/press/pp/307001en.pdf>
2. Carson, P. E.; Flanagan, C. L.; Ickes, C. E.; Alving, A. S.: Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* 1956; 124(3220):484-5.
3. Motulsky, A. G.: Drug reactions, enzymes, and biochemical genetics. *JAMA* 1957; 165:835-7.
4. Kalow, W.: Familial incidence of low pseudocholinesterase level. *Lancet* 1956; 2:576-576.
5. Evans, D. A.; Manley, F. A.; McKusick, V. A.: Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br Med J* 1960; 5197:485-91.
6. Vesell, E. S.: Pharmacogenetic perspectives gained from twin and family studies. *Pharmacol Ther* 1989; 41(3):535-52.
7. Mahgoub, A.; Idle, J. R.; Dring, L. G.; Lancaster, R.; Smith, R. L.: Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet* 1977; 2(8038):584-6.
8. Eichelbaum, M.; Spannbrucker, N.; Steincke, B.; Dengler, H. J.: Defective N-oxidation of sparteine in man, a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol* 1979; 16(3):183-7.
9. Gonzalez, F. J.; Skoda, R. C.; Kimura, S.; Umeno, M.; Zanger, U. M.; Nebert, D. W.; *et al.*: Characterization of the common genetic-defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* 1988; 331(6155):442-6.
10. Meyer, U. A.; Zanger, U. M.: Molecular mechanism of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37:269-96.
11. Evans, W. E.; Relling, M. V.: Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999; 286(5439):487-91.
12. Meyer, U. A.: Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet* 2000; 356(9242):1667-71.
13. Meyer, U. A.: Introduction to Pharmacogenomics: promises, opportunities, and limitations. In: Licino J, Wong M-L, editors. *Pharmacogenomics. The search for individualized therapies*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002: 1-8.
14. Evans, W. E.; McLeod, H. L.: Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 2003; 348(6):538-49.
15. Meyer, U. A.: Genotype or phenotype: the definition of a pharmacogenetic polymorphism. *Pharmacogenetics* 1991; 1(2):66-7.
16. Roses, A. D.: Pharmacogenetics and future drug development and delivery. *Lancet* 2000; 355 (9212):1358-61.
17. Evans, W. E.; Johnson, J. A.: Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001; 2:9-39.
18. McLeod, H. L.; Evans, W. E.: Pharmacogenomics: unlocking the human genome for better drug therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:101-21.
19. Kalow, W.: Interethnic differences in drug response. In: Kalow W, Meyer UA, Tyndale RF, editors. *Pharmacogenomics*. New York, Basel: Marcel Dekker, 2001: 109-34.
20. Ingelman-Sundberg, M.; Oscarson, M.; McLellan, R. A.: Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20(8):342-9.
21. Silber, B. M.: Pharmacogenomics, biomarkers, and the promise of personalized medicine. In: Kalow W, Meyer UA, Tyndale RF, editors. *Pharmacogenomics*. New York, Basel: Marcel Dekker, 2001: 11-31.
22. Lazarou, J.; Pomeranz, B. H.; Corey, P. N.: Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospectives studies. *JAMA* 1998; 279(15):1200-5.

23. White, T. J.; Arakelian, A.; Rho, J. P.: Counting the costs of drug-related adverse events. *Pharmacoeconomics* 1999; 15(5):445-58.
24. Kirchheiner, J.; Brosen, K.; Dahl, M. L.; Gram, L. F.; Kasper, S.; Roots, I.; *et al.*: CYP2D6 and CYP2C19 genotype-based dose recommendations for antidepressants: a first step towards subpopulation-specific dosages. *Acta Psychiatr Scand* 2001; 104(3):173-92.
25. Essioux, I.; Destenaves, B.; Jais, P.; Thomas, F.: Association studies in pharmacogenomics. In: Licino J, Wong M-L, editors. *Pharmacogenomics. The search for individualized therapies*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002: 65.
26. Kroemer, H. K.; Eichelbaum, M.: "It's the genes, stupid": molecular bases and clinical consequences of genetic cytochrome P450 2D6 polymorphism. *Life Sci* 1995; 56(26):2285-98.
27. Bertilsson, L.; Lou, Y. Q.; Du, Y. L.; Liu, Y.; Kuang, T. Y.; Liao, X. M.; *et al.*: Pronounced differences between native Chinese and Swedish populations in the polymorphic hydroxylations of debrisoquin and S-mephenytoin. *Clin Pharmacol Ther* 1992; 51(4):388-97. [Erratum in: 1994; 55(6):648].
28. Daly, A. K.: Molecular basis of polymorphic drug metabolism. *J Mol Med* 1995; 73(11):539-53.
29. Sachse, C.; Brockmoller, J.; Bauer, S.; Roots, I.: Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 1997; 60(2):284-95.
30. Dalen, P.; Dahl, M. L.; Ruiz, M. L. B.; Nordin, J.; Bertilsson, L.: 10-Hydroxylation of nortriptyline in white persons with 0, 1, 2, 3, and 13 functional CYP2D6 genes. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 63(4):444-52.
31. Kimura, S.; Umeno, M.; Skoda, R.; Meyer, U. A.; González, F. J.: The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene and a pseudogene. *Am J Hum Genet* 1989; 45(6):889-904.
32. Ingelman-Sundberg, M.; Evans, W. E.: Unravelling the functional genomics of the human CYP2D6 gene locus. *Pharmacogenetics* 2001; 11(7):553-4.
33. Brockmoller, J.; Kirchheiner, J.; Meisel, C.; Roots, I.: Pharmacogenetic diagnostics of cytochrome P450 polymorphisms in clinical drug development and in drug treatment. *Pharmacogenomics* 2000; 1(2):125-51.
34. Meisel, C.; Roots, I.; Cascorbi, I.; Brinkmann, U.; Brockmoller, J.: How to manage individualized drug therapy: application of pharmacogenetic knowledge of drug metabolism and transport. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38(9):869-76.
35. Poulsen, L.; Brosen, K.; Arendt-Nielsen, L.; Gram, L. F.; Elbaek, K.; Sindrup, S. H.: Codeine and morphine in extensive and poor metabolizers of sparteine: pharmacokinetics, analgesic effect and side effects. *Eur J Clin Pharmacol* 1996; 51(3-4):289-95.
36. Dalen, P.; Frengell, C.; Dahl, M. L.; Sjoqvist, F.: Quick onset of severe abdominal pain after codeine in an ultrarapid metabolizer of debrisoquine. *Ther Drug Monitor* 1997; 19(5):543-4.
37. Stubbins, M. J.; Harris, L. W.; Smith, G.; Tarbit, M. H.; Wolf, C. R.: Genetic analysis of the human cytochrome P450 CYP2C9 locus. *Pharmacogenetics* 1996; 6(5):429-39.
38. De Morais, S. M.; Wilkinson, G. R.; Blaisdell, J.; Nakamura, K.; Meyer, U. A.; Goldstein, J. A.: The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J Biol Chem* 1994; 269(22):15419-22.
39. Kuehl, P.; Zhang, J.; Lin, Y.; Lamba, J.; Assem, M.; Schuetz, J.; *et al.*: Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; 27(4):383-91.
40. Weinshilboum, R. M.: Inheritance and drug response *N Engl J Med* 2003; 348(6):529-37.
41. Tuchman, M.; Stoeckeler, J. S.; Kiang, D. T.; O'Dea, R. F.; Ramnaraine, M. L.; Mirkin, B. L.: Familial pyrimidinemia and pyrimidinuria associated with severe fluorouracil toxicity. *N Engl J Med* 1985; 313(4):245-9.



42. Diasio, R. B.; Beavers, T. L.; Carpenter, J. T.: Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase: biochemical basis for familial pyrimidinemia and severe 5-fluorouracil-induced toxicity. *J Clin Invest* 1988; 81(1):47-51.
43. Lin, H. J.; Han, C-Y.; Lin, B. K.; Hardy, S.: Slow acetylators mutations in the human polymorphic N-acetyltransferase gene in 786 Asians, blacks, Hispanics, and whites: application to metabolic epidemiology. *Am J Hum Genet* 1993; 52(4):827-34.
44. Lennard, L.: The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol* 1992; 43(4):329-39.
45. Otterness, D.; Szumlanski, C.; Lennard, L.; Klemetsdal, B.; Aarbakke, J.; Park-Hah, J. O.; *et al.*: Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 62(1):60-73.
46. Lennard, L.; Van Loon, J. A.; Weinshilboum, R. M.: Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 1989; 46(2):149-54.
47. Weinshilboum, R. M.; Otterness, D. M.; Szumlanski, C. L.: Methylation pharmacogenetics: catechol O-methyltransferase, thiopurine methyltransferase, and histamine N-methyltransferase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39:19-52.
48. Lennard, L.; Lilleyman, J. S.; Van Loon, J.; Weinshilboum, R. M.: Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1990; 336(8709):225-9.
49. Thiebaut, F.; Tsuruo, T.; Hamada, H.; Gottesman, M. M.; Pastan, I.; Willingham, M. C.: Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 84(21):7735-8.
50. Borst, P.; Evers, R.; Kool, M.; Wijnholds, J.: A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(16):1295-1302.
51. Brinkmann, U.; Roots, I.; Eichelbaum, M.: Pharmacogenetics of the human drug-transporter gene MDR1: impact of polymorphisms on pharmacotherapy. *Drug Discov Today* 2001; 6(16):835-9.
52. Hoffmeyer, S.; Burk, O.; von Richter, O.; Arnold, H. P.; Brockmoller, J.; John, A.; *et al.*: Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(7):3473-8.
53. Sakaeda, T.; Nakamura, T.; Horinouchi, M.; Kakumoto, M.; Ohmoto, N.; Sakai, T.; *et al.*: MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Res* 2001; 18(10):1400-4.
54. McLeod, H. L.: Pharmacokinetic differences between ethnic groups. *Lancet* 2002; 359(9300):78.
55. Ambudkar, S. V.; Dey, S.; Hrycyna, C. A.; Ramachandra, M.; Pastan, I.; Gottesman, M. M.: Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39:361-98.
56. Tan, S.; Hall, I. P.; Dewar, J.; Dow, E.; Lipworth, B.: Association between beta 2-adrenoceptor polymorphism and susceptibility to bronchodilator desensitisation in moderately severe stable asthmatics. *Lancet* 1997; 350(9083):995-9.
57. Cockcroft, J. R.; Gazis, A. G.; Cross, D. J.; Wheatley, A.; Dewar, J.; Hall, I. P.; *et al.*: Beta(2)-adrenoceptor polymorphism determines vascular reactivity in humans. *Hypertension* 2000; 36(3):371-5.
58. Liggett, S. B.: Beta(2)-adrenergic receptor pharmacogenetics. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(3 Pt 2):S197-201.
59. Dishy, V.; Sofowora, G. G.; Xie, H. G.; Kim, R. B.; Byrne, D. W.; Stein, C. M.; *et al.*: The effect of common polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor on agonist-mediated vascular desensitization. *N Engl J Med* 2001; 345(14):1030-5.

60. Drazen, J. M.; Yandava, C. N.; Dube, L.; Szczerback, N.; Hippensteel, R.; Pillari, A.; *et al.*: Pharmacogenetic association between ALOX5 promoter genotype and the response to anti-asthma treatment. *Nat Genet* 1999; 22(2):168-70.
61. Jacobsen, P.; Rossing, K.; Rossing, P.; Tarnow, L.; Mallet, C.; Poirier, O.; *et al.*: Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and ACE inhibition in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1998; 53(4):1002-6.
62. Esteller, M.; García-Foncillas, J.; Andion, E.; Goodman, S. N.; Hidalgo, O. F.; Vanaclocha, V.; *et al.*: Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000; 343(19):1350-4. [Erratum in: 343(23):1740].
63. Jonhson, J. A.; Lima, J. J.: Drug receptor/effector polymorphisms and pharmacogenetics: current status and challenges. *Pharmacogenetics* 2003; 13(9):525-34.
64. Martinelli, I.; Sacchi, E.; Landi, G.; Taioli, E.; Duca, F.; Mannucci, P. M.: High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. *N Engl J Med* 1998; 338(25):1793-7.
65. Kuivenhoven, J. A.; Jukema, J. W.; Zwinderman, A. H.; de Knijff, P.; McPherson, R.; Bruschke, A. V.; *et al.*: The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. The Regression Growth Evaluation Statin Study Group. *N Engl J Med* 1998; 338(2):86-93.
66. Gerdes, L. U.; Gerdes, C.; Kervinen, K.; Savolainen, M.; Klausen, I. C.; Hansen, P. S.; *et al.*: The apolipoprotein epsilon4 allele determines prognosis and the effect on prognosis of simvastatin in survivors of myocardial infarction: a substudy of the Scandinavian simvastatin survival study. *Circulation* 2000; 101(12):1366-71.
67. Issa, A. M.; Keyserlingk, E. W.: Apolipoprotein E genotyping for pharmacogenetic purposes in Alzheimer's disease: emerging ethical issues. *Can J Psychiatry* 2000; 45(10):917-22.
68. Siest, G.; Bertrand, P.; Herbeth, B.; Vincent-Viry, M.; Schiele, F.; Sass, C.; *et al.*: Apolipoprotein E polymorphisms and concentration in chronic diseases and drug responses. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38(9):841-52.



Capítulo V:

Desde la enfermedad: Una visión de la tecnología y la investigación clínica experimental

Autores:

Enrique Castellón Leal

- Gerente de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Consejería de Sanidad y Consumo, Comunidad de Madrid.

Milagros González Rivera

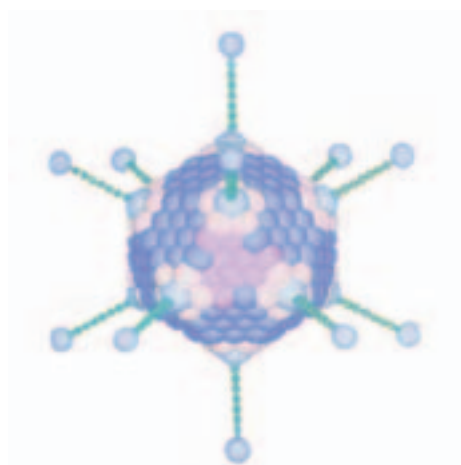
- Médico Especialista en Análisis Clínicos, Hospital Universitario La Paz y Universidad Autónoma de Madrid. Master en Biotecnología por el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Universidad Autónoma de Madrid. Médico Especialista Señor en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Línea Instrumental Secuenciación).

Jesús Francisco Bermejo Martín

- Médico Especialista en Inmunología Clínica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón y Universidad Complutense de Madrid. Investigador del programa BEFI del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS).

M^a Ángeles Muñoz Fernández

- Doctora en Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. Facultativa Adjunta y Directora del Laboratorio de Inmunobiología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón.



Desde la enfermedad: Una visión de la tecnología y la investigación clínica experimental

○ Introducción

La infinidad de procesos y reacciones bioquímicas que subyacen en la fisiopatología humana no es conocida hasta un último término. A medida que la tecnología avanza, por los descubrimientos en otras disciplinas científicas (matemáticas, física, química, etc.), se descubren cada año elementos moleculares que están detrás de procesos nosológicos conocidos y muchas veces englobados en conjuntos sindrómicos.

Entre las diferentes etapas del proceso de investigación biomédica, la investigación traslacional responde a la necesidad de que la tecnología desemboque rápidamente en aplicaciones a la cabecera del enfermo. En dirección opuesta, del conocimiento de las enfermedades en la esfera de la actividad clínica se extraen aportaciones que encaminan la investigación hacia la consecución de respuestas más eficaces. En todo ello, tiene mucho que ver la proximidad intelectual y física de médicos asistenciales e investigadores básicos y clínicos y la convergencia de grupos y centros. Todo esto requiere apoyos firmes e inteligentemente dirigidos, que sean producto de una política científica que se tornará eficaz respecto al proceso descrito más arriba.

Creemos que una forma de acercarse al conocimiento de la tecnología, para el conjunto de médicos y facultativos que atienden al paciente, es introducir-presentar enfermedades cuyas causas están siendo investigadas gracias a la disponibilidad de la tecnología identificada por la Fundación Genoma España. De esta forma, más que abordar una explicación de cómo las tecnologías funcionan, que requeriría un compendio fuera del objetivo de esta publicación, pretendemos presentar cómo se aplican para tratar de responder a las hipótesis que se establecen sobre la etiología o fisiopatología de las enfermedades. Para ello hemos seleccionado algunos trabajos recientes que muestran la utilización de las tecnologías críticas.

○ Desde la miocardiopatía dilatada: Una visión de la proteómica

La miocardiopatía dilatada (MCD) es la causa más frecuente de trasplante cardíaco, su incidencia anual es de 5-8 pacientes por 100.000. Su etiología es desconocida, aunque parece estar asociada a múltiples factores, entre ellos los de causa genética. El diagnóstico mediante ecografía, cateterismo, etc. se hace más preciso con el estudio anatomopatológico del músculo cardíaco mediante biopsia. Pero la pregunta sería ¿podemos llegar a conocer algún marcador más, que diferencie lo que está sucediendo en la célula cardíaca enferma y que no sucede en la célula sana? En la revisión realizada por Vivanco y cols. (1) se describe cómo la utilización de la tecnología de separación e identificación de proteínas¹ ha permitido describir que en tejido de MCD se presenta un nivel menor de expresión de 88 proteínas en comparación con lo encontrado en muestras de cardiopatía isquémica. A su vez se describe un incremento en la expresión de diversas enzimas del sistema ubiquitina hidrolasa C-terminal, que permite establecer una hipótesis del mecanismo patológico que contribuye a la transición de una hipertrofia compensada al fallo cardíaco de la MCD. De esta forma además, se identifica la posible diana terapéutica en esta enfermedad cardíaca. Como se describe en esta revisión, gracias a la tecnología se puede definir el perfil proteico de la célula cardíaca enferma, que no es más que el conjunto de las proteínas expresadas y sus cambios en la muestra estudiada o patológica frente a una muestra control. Aunque todas las células de un organismo, poseen una carga genética común, sólo se expresan aquellos genes cuyas proteínas proporcionan funciones esenciales celulares y aquellos que proporcionen las funciones que le son específicas a cada tipo celular. Esto es el proteoma celular, que es un conjunto dinámico de proteínas cambiantes sintetizadas en un tipo de célula y bajo unas circunstancias específicas. La tecnología permite realizar lisados celulares y mediante técnicas de

¹ Tecnología 1. Automatización de la separación e identificación de proteínas, mediante cromatografía multidimensional combinado con el uso de espectrómetros de masas y herramientas eficientes para el análisis de datos.

separación como son la electroforesis bidimensional o la cromatografía multidimensional realizar un aislamiento de la ingente cantidad de proteínas que contiene una célula. Estas proteínas, una vez separadas se someten a las digestiones necesarias para presentar una muestra adecuada a las condiciones de análisis del espectrómetro de masas, en sus diferentes versiones. La espectrometría de masas (MS) permite determinar las masas moleculares de las unidades proteicas más pequeñas (péptidos), de forma que tras la búsqueda en bases de datos se determine la identidad de la proteína analizada. Esta tecnología requiere el apoyo de herramientas de análisis masivo de datos. En concreto en la patología descrita, se están estableciendo las bases de datos de las proteínas del miocardio, siendo accesibles por internet.

○ Desde la enfermedad de alzheimer: Una visión de la estructura de proteínas y modelos Knock-out

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más frecuente de demencia en mayores de 65 años, afectando a un 10% de esta población y aproximadamente a un 50% de los mayores de 85 años. Su incidencia se está incrementando de forma exponencial. Clínicamente se caracteriza por la pérdida progresiva de las capacidades cognitivas. El diagnóstico basado en el examen neurológico, test neuropsicológicos y técnicas de imagen cerebral, sólo es definitivo (excluyendo así otras causas de demencia) cuando se detectan los hallazgos neuropatológicos característicos: 1) depósitos de amiloide o placas seniles extracelulares, 2) haces neurofibrilares intraneuronales, 3) angiopatía amiloide cerebral y 4) pérdida de sinapsis. Aunque estos hallazgos están bien definidos, los mecanismos responsables del proceso patogénico no han sido claramente determinados. Se conoce la EA familiar de comienzo precoz, con implicación de al menos tres genes, pero el 95-98% de los casos de EA son de comienzo tardío (>65 años) sin un patrón de herencia mendeliana. Múltiples son los estudios que implican diferentes genes (APOE, etc.) así como factores ambientales, lo que sugiere una etiología compleja. A lo largo de la última década se ha estudiado la formación de la placa de amiloide a partir de la proteína precursora de amiloide (APP) y se ha definido la hipótesis de la cascada amiloidea (2). Según los autores que proponen esta patogenia, la agregación de placas amiloides desencadena la cascada neurotóxica e inmunológica que dar lugar a las manifestaciones clínicas y patológicas propias de esta demencia. La Enfermedad de Alzheimer de causa hereditaria y comienzo en edad temprana está asociada a un incremento del péptido Aβ42, que es un producto de la proteólisis del APP a través de la vía de las β-secretasas. Aún cuando la EA no familiar no esté producida por un incremento del péptido Aβ42, parece que, en todo caso, éste juega un papel central (3) en la cascada de producción de la placa amiloidea. En la revisión realizada por Citron (4) se describe el camino de investigación experimental seguido hasta la identificación de las enzimas que catalizan la proteólisis del APP, llegando a la identificación de la BACE1 como la β-secretasa más importante en neuronas. El estudio de esta enzima llevó al conocimiento de su secuencia de aminoácidos, sus sitios catalíticos y a la predicción de su estructura secundaria. Parecía que si se conseguía una inhibición de esta enzima, la APP no sería escindida por la vía de las β-secretasas impidiendo la formación del Aβ42. *La pregunta en este caso era ¿cómo diseñar un inhibidor de la BACE1?* La aplicación de la tecnología de estudio de la estructura terciaria de proteínas² permitiría conocer cual es la conformación en el espacio de una proteína como la BACE1 y así deducir la forma de interacción con sus sitios catalíticos, detalles del sitio activo (5) y diseñar un inhibidor eficaz.

Existen varias formas de abordar este estudio: cristalización proteica y la difracción de rayos X, la resonancia magnética nuclear (RMN) o los modelos de predicción matemáticos a partir del conocimiento de la secuencia proteica. La cristalización de proteínas no es una tarea sencilla, muchas proteínas altamente hidrofóbicas no pueden ser cristalizadas. El cristal a conseguir debe ser único y de calidad perfecta para obtener un buen mapa de difracción. La irradiación de rayos X sobre el cristal genera un patrón o imagen tridimensional de nubes electrónicas que se interpreta al construir un modelo de la proteína, que posteriormente se refina teniendo en cuenta otras variables (temperatura,

² T2 Predicción y establecimiento de la estructura terciaria de proteínas por métodos de alto rendimiento en cristalización y difracción y obtención de modelos de predicción de estructura terciaria de proteínas a partir de la secuencia.

movimiento térmico, etc.). La RMN determina estructuras de proteínas en solución, pero está limitada a moléculas pequeñas, no más de 30 kD. Se suele utilizar para proteínas pequeñas que no pueden ser cristalizadas. El resultado del análisis de RMN es, en realidad, un conjunto de modelos alternativos de estructura, en contraste con el modelo único que se obtiene por la cristalografía.

Los resultados empíricos de estos métodos experimentales describen adecuadamente la estructura tridimensional de la molécula en el estado en el cual se realizaron las cuantificaciones. Los cristales de proteína que se utilizan en los estudios de difracción están altamente hidratados, por lo que las estructuras determinadas a partir de estos cristales no son muy diferentes de las estructuras de proteínas solubles en solución acuosa. Algunas moléculas se han estudiado tanto por cristalografía como por RMN en solución, en estos casos la correlación es excelente.

Los resultados obtenidos en el estudio de proteínas son compartidos por el mundo científico gracias a la existencia de grandes bases de datos³ Protein Data Bank (PDB), donde se depositan las secuencias de aminoácidos, datos de cristalización, de difracción y RMN pudiendo así predecir funcionalidad y comportamiento de otras proteínas sobre las que surjan nuevas preguntas. Las estructuras así obtenidas, lo son por modelaje. Un tipo de modelaje denominado modelaje de homología, ajusta una secuencia conocida a la estructura tridimensional obtenida experimentalmente de una molécula de secuencia similar.

Los datos tridimensionales de estructuras macromoleculares depositados en el PDB han sido obtenidos por alguno de los siguientes métodos: cristalografía de rayos X (en su mayoría), RMN en solución o modelaje molecular. Pocas estructuras se han determinado por otros métodos (difracción de rayos X en sincrotrón, difracción de electrones, microscopía electrónica, difracción de fibra, difracción de neutrones o fluorescencia de transferencia).

Volviendo a la enfermedad que nos ocupa, se ha conseguido la estructura cristalina de la BACE1 unida a un péptido inhibidor y esta información está disponible para así facilitar el desarrollo de los inhibidores.

Si se desarrollan inhibidores eficaces de la BACE1, parece que se podrían ofertar tratamientos eficaces contra la enfermedad de Alzheimer, pero ¿en qué otros procesos fisiológicos estaría implicada la BACE1?

Se conoce que las secretasas como la aquí estudiada tienen otras localizaciones y se supone que estas enzimas tendrán otros sustratos además de la APP, tendrán otras funciones que no solamente la patogénica. *La pregunta a resolver es ¿qué sucedería si se produjera una inhibición de las β secretasas?, ¿qué otras repercusiones tendría en otras partes del organismo?* Para resolver este tipo de preguntas, la aplicación de la tecnología de generación de animales transgénicos⁴ resuelve en tiempo aceptable enigmas que necesitarían ensayos clínicos en fase I.

Citron (4) y otros autores generaron ratones modificados genéticamente de forma que el gen de la BACE1 estuviera suprimido; esto es lo que se denomina el ratón knockout BACE1. Con ello comprobaron, por un lado, que este ratón no segregaba el péptido A β 42, y por otro lado, que el fenotipo murino era normal sin afectación aparente morfológica, anatómica, histológica, de parámetros hematológicos y bioquímicos y de las funciones fisiológicas y neurológicas basales.

Los animales modificados genéticamente (o transgénicos) son aquellos en los que se ha insertado material genético extraño o bien a los que se les ha eliminado uno o varios genes (estos son conocidos como "knockout" por la terminología inglesa). La transgénesis es una tecnología radicalmente nueva que altera las características de los animales al cambiar directamente su material genético. Como el ADN contiene un código genético universal que es común a todos los organismos vivos, en principio, puede transferirse entre organismos que no pertenezcan a la misma especie para producir otros con características particulares dirigidas al estudio concreto. La sustitución de un gen del animal por otro homólogo mutado, alterado o humano se conoce como modelo "knockin",

³ T3 Desarrollo de algoritmos y herramientas de bioinformática para predecir bioactividad y funcionalidad de proteínas.

⁴ T8 Métodos de alto rendimiento para la generación y análisis de modelos de animales modificados genéticamente (knock-out, knock in).

de esta forma se puede determinar la susceptibilidad a una determinada enfermedad o la influencia de las variantes alélicas humanas (6). Los animales modificados genéticamente permiten mediante el silenciamiento, eliminación o sobreexpresión de un gen, presumiblemente implicado en un proceso patológico, crear un modelo de dicha enfermedad, en lo que se conoce como genética reversa. Es decir se elimina un gen y se observa el fenotipo deseado y no al contrario (genética clásica) donde a partir de un determinado fenotipo se identificaba el gen responsable.

Existen muchos ejemplos de las aplicaciones de estos modelos en el estudio de enfermedades cardiovasculares (7), neurológicas (8), mitocondriales (9), reproductivas, etc. Se prevé que en un futuro cercano, el desarrollo de métodos de alto rendimiento que puedan generar modelos animales para el estudio de genes humanos y sus variantes alélicas.

○ La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana: Una visión del iRNA

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) constituye en la actualidad una pandemia con implicaciones políticas, económicas y sociales que trasciende el campo de la salud pública. De acuerdo a la OMS más de 40 millones de personas en todo el mundo están actualmente infectadas y la fase final de la infección, SIDA ha causado más de 20 millones de muertes.

El VIH es un retrovirus profusa y profundamente estudiado, lo que ha permitido que, en menos de una década desde la identificación de la causa de la enfermedad se hayan desarrollado diversas pautas de tratamiento con distinta eficacia. Desde la instauración de los denominados regímenes de gran actividad (TARGA) en 1996, se ha obtenido una disminución de la mortalidad y la morbilidad (10, 11) en los países occidentales, facilitando que la infección VIH pase de ser una infección mortal, a una enfermedad crónica.

Los fármacos antirretrovirales administrados hasta el momento están dirigidos a la inactivación e inhibición de las enzimas víricas claves para la replicación viral (inhibidores de Transcriptasa Inversa y de la Proteasa). Con este mecanismo de acción no han conseguido la erradicación del VIH de las células reservorio. No hay que olvidar que este virus requiere la integración de su genoma en el genoma de la célula diana y además, necesita la maquinaria de activación de la célula huésped para la formación de nuevas partículas víricas que perpetúen la especie. Esto implica que una vez el VIH se ha integrado en el genoma celular puede permanecer quiescente en la célula diana; además, algunos fármacos antirretrovirales no son capaces de atravesar barreras anatomo-histológicas, como la hematoencefálica conformándose así dichos reservorios (12). Por otro lado, estos fármacos no están exentos de efectos secundarios, su administración a largo plazo afecta el metabolismo lipídico y mitocondrial ocasionando patologías secundarias (hipertrigliceridemias, hiperlactacidemias, lipodistrofia, diabetes, riesgo cardiovascular, etc.) que afectan al riesgo y la calidad de vida del paciente.

Son múltiples las investigaciones encaminadas a encontrar nuevas dianas terapéuticas en la infección VIH, y entre ellas se está intentando imitar un fenómeno natural descrito por primera vez en plantas (13) que se denominó "silenciamiento génico postranscripcional (PTGS)". Mediante esta función, la célula establece un mecanismo de defensa natural contra los intrusos, es una protección del genoma celular frente a otros elementos genéticos, como los virus, mediando la degradación de sus ARN mensajeros. Fire y cols. (14) describieron esta función en un nematodo y aportaron la denominación actual del PTGS como "ARN de interferencia".

El ARN de interferencia (RNAi) ha provocado un gran impacto en el mundo de la Biología Molecular comparable, como ejemplo, al del descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los RNAi⁵ son pequeños ARNs de cadena doble que son capaces de inhibir la traducción de una determinada proteína endógena o exógena (patógeno) al inducir la degradación de su ARN homólogo. En este sentido, se están desarrollando RNAi inhibidores del ciclo replicativo del VIH, bien inhibiendo la síntesis de los receptores

⁵ T9 siRNA (Small Interferente RNA) Para el análisis funcional masivo y validación de dianas terapéuticas.

celulares que utiliza el virus para infectar las células, bien inhibiendo la síntesis de proteínas propiamente virales (15, 17).

Recientemente, se ha descrito que los ARNs de doble cadena además de actuar a nivel postranscripcional, parece que también, pudieran mediar pasos regulatorios a nivel transcripcional (metilación de ADN, formación de heterocromatina o eliminación de ADN), operando tanto en el núcleo como en el citoplasma. Los RNAi parecen desarrollar, por tanto, un papel clave en la regulación de la expresión génica. Consiguientemente surge la pregunta ¿qué papel desarrollan en la respuesta de plantas y animales ante agentes infecciosos como virus y priones? ¿Qué papel desempeñan en la tumorigénesis?

En los últimos años han surgido múltiples grupos que investigan el papel de estos ARNs en el estudio del proteoma: bien sea la modulación de la expresión de distintas proteínas celulares por los RNAi, o bien usando RNAi para evaluar la función de dichas proteínas (viendo que es lo que ocurre al suprimir su presencia).

Para facilitar estos objetivos, se ha desarrollado en los últimos años una amplia gama de tecnologías de trabajo con RNAi. Los RNAi pueden ser sintetizados química o biotecnológicamente mediante plásmidos codificantes de RNAi.

En resumen, el descubrimiento de los RNAi abre todo un mundo de posibilidades de aplicación en Biomedicina, que nos llevará a un mejor conocimiento del funcionamiento de nuestro código genético, así como toda una serie de opciones de actuación sobre proteínas implicadas en la patogénesis de distintas enfermedades de origen genético, infeccioso o tumoral. ¿Podremos desarrollar RNAi que actúen como fármacos contra el VIH, o que supriman una proteína implicada en la génesis de una neoplasia, o que actúen inhibiendo la síntesis de proteínas priónicas? ¿Podremos lograr RNAi suficientemente estables para lograr esos objetivos? ¿Qué tolerancia tendría la administración de los mismos in vivo? ¿Qué reacciones inmunológicas inducirían? ¿Qué biodisponibilidad intracelular presentarían (probablemente mejorada con la ayuda de vehículos transfectantes)? Todas estas preguntas aguardan ser respondidas y constituyen un desafío para médicos e investigadores en los próximos años.

○ Desde la inmunodeficiencia combinada severa: Una visión de los vectores para Terapia Génica

Hay enfermedades que claramente están originadas por la disfunción de un gen específico (enfermedades monogénicas). Estas enfermedades son por ello susceptibles de tratamiento mediante la introducción del gen de forma exógena mediante el uso de distintos vehículos (vectores). La Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID) es un ejemplo. Se trata de una enfermedad letal de origen hereditario por deficiencia del gen de la cadena gamma común (un componente de los receptores de interleucinas), afectando gravemente al número de linfocitos y su función que provoca como su nombre indica una inmunodeficiencia severa. Tras un gran éxito inicial, los ensayos de Terapia Génica sustitutiva en pacientes con SCID han tenido que ser suspendidos por la aparición de tumores linfoproliferativos al postularse que el vehículo usado, de naturaleza viral, tiene la posibilidad de activar proto-oncogenes o inactivar genes esenciales o supresores de tumores, al insertarse en cualquier zona del genoma (18). En septiembre del 2000 se produjo el fallecimiento en Estados Unidos de un paciente que había sido tratado de una enfermedad metabólica (la deficiencia de ornitina-transcarbamilasa) mediante terapia génica utilizando adenovirus como vehículo. Se sospecha que este adenovirus, inyectado en grandes dosis, pudiera haber desencadenado una respuesta inmune patogénica. La utilización de vehículos virales para transfección de genes tiene el inconveniente de que el virus introduce su material genético en las células humanas; existe una gran controversia sobre las consecuencias que pudiera tener a largo plazo la incorporación de material genético no humano. La razón de la utilización de virus en Terapia Génica sustitutiva de un gen defectuoso es que permite la expresión estable de un gen; pero esto no es tan importante si lo que se desea es inhibir la expresión. Todo ello hace imprescindible trabajar en el desarrollo de nuevos vehículos de naturaleza no viral o delimitar más los riesgos de los virales para que la Terapia Génica pueda llegar a tener un futuro como tal.

El concepto de Terapia Génica podemos abordarlo de una forma somera desde diferentes definiciones como son:

- "ES LA INTRODUCCIÓN DE MATERIAL EXÓGENO (NATURAL O RECOMBINANTE) EN SUJETOS HUMANOS PARA CORREGIR DEFICIENCIAS CELULARES EXPRESADAS EN EL NIVEL FENOTÍPICO".
- "ES UNA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA BASADA EN LA MODIFICACIÓN DEL REPERTORIO GENÉTICO DE CÉLULAS SOMÁTICAS MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y DESTINADA A CURAR TANTO ENFERMEDADES DE ORIGEN HEREDITARIO COMO ADQUIRIDO".
- "ES LA TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO NUEVO A CÉLULAS DE UN INDIVIDUO DANDO LUGAR A UN BENEFICIO TERAPÉUTICO PARA EL MISMO".
- "LA TRANSFERENCIA IN VIVO O EX-VIVO DE UNA SECUENCIA GENÉTICA PARA REEMPLAZAR MATERIAL GENÉTICO DEFECTUOSO O CONFERIR UNA NUEVA ACTIVIDAD CELULAR".

Existen diferentes tipos de vectores. Los más clásicos han sido los virales (adenovirus y retrovirus como los más frecuentes), previamente citados. Pero además de los vectores virales, hay otras formas de introducir material génico en las células:

MÉTODOS FÍSICOS

Microinyección directa, electroporación y nucleofección, ultrasonidos, etc. Utilizables en todo caso en terapia génica ex-vivo: tratando células en el laboratorio con el ácido nucleico y reinfundiéndolas luego.

MÉTODOS QUÍMICOS

Esencialmente centrados en la utilización de sistemas catiónicos capaces de complejar el ADN, o el ARN neutralizando parcial o totalmente la carga negativa del ácido nucleico (agentes ambifílicos complejantes con el ADN).

Un buen transportador debe reunir características de biocompatibilidad, atoxicidad, que no produzca reacción inmunológica, que disponga de grupos funcionales adecuados para permitir la fijación química, mantener la actividad del ácido nucleico hasta llegar al sitio de acción y con una limitada acumulación corporal.

Los sistemas químicos sintéticos utilizados hasta la fecha son esencialmente de cuatro tipos:

- LIPOSOMAS CATIÓNICOS (LIPOPLEXES). EJ: CITOFECTINAS.
- POLÍMEROS CATIÓNICOS (POLIPLEXES). EJ: POLILISINA, POLIETILENIMINAS.
- COPOLÍMEROS EN BLOQUE. EJ: PLURONIC P85.
- DENDRÍMEROS (DENDRIPLEXES). EJ: PAMAM.

Respecto a los liposomas y otros vehículos lipoides, los lípidos catiónicos se han usado en Terapia Génica en ratones; sin embargo, una respuesta inflamatoria a los lípidos limita su utilización (19). Además, los vehículos lipoides presentan baja eficiencia de transfección en presencia de suero; el suero se puede retirar del medio o sobrenadante en el caso de células en cultivo, pero nunca en un paciente. Con respecto a los polímeros catiónicos, estos poseen los mismos inconvenientes, además de tratarse de sistema polidispersos y por tanto de estructura no bien definida.

La nanotecnología (es decir, el desarrollo de dispositivos en escala nanométrica) es un nuevo campo con aplicación en múltiples apartados de la Ciencia (sobre todo en electrónica), siendo los dendrímeros los primeros nanocompuestos con actividad biológica. El interés por los polímeros dendríticos ha aumentado mucho en la década pasada debido al uso de estas moléculas en numerosas aplicaciones industriales y biomédicas. Una clase particular de dendrímeros (del griego dendron, ramas) son los poliamidoaminados (PAMAM), capaces de formar complejos con ADN plasmídico, oligonucleótidos, ARN lineal, y ADN de doble cadena lineal de varios tamaños (20).

Los nuevos vehículos deberán superar la dificultad que algunas células presentan para ser transfectadas con ácidos nucleicos (por ejemplo, los linfocitos). En cuanto a la terapia génica sustitutiva, se deberá estudiar la capacidad que presentan para transportar y lograr que el gen se exprese el suficiente tiempo para que merezca la pena plantearse una terapia con ellos. Concretamente en SCID, la extracción de linfocitos y su tratamiento ex-vivo con reinfusión podría ser una buena opción. El concepto clásico de terapia génica para la sustitución de un gen defectuoso se ha ampliado para incluir la intervención sobre genes tumorales y de patógenos. Así, la utilización de estos vehículos para transporte de ARN de interferencia o de oligonucleótidos antisentido (aquellos con secuencia contraria a la diana) se convertirá en prioritaria en los próximos años. Finalmente, la consecución de vectores con selectividad por el tejido-órgano deseado como objeto de la terapia es otro de los objetivos en este campo: aportamos aquí los ejemplos de un vector adenoviral con selectividad para células que expresan el marcador CD40 en superficie (21) y de un retrovirus con selectividad por células hepáticas (22).

De todo lo expuesto se puede extraer que el desarrollo de la Terapia Génica como herramienta útil en medicina depende en gran grado del desarrollo de estos nuevos vectores.

○ Desde el cáncer de mama: Una visión de la tecnología de los ADN array y los Anticuerpos Monoclonales

El cáncer de mama es la segunda causa de muerte en mujeres en el mundo occidental. La incidencia se estima en el 11-12% en población general. La investigación clínica de esta patología se ha focalizado en métodos efectivos para detectar la enfermedad en los estadios más precoces. La detección precoz del cáncer (CA) de mama mejora el pronóstico y las tasas de supervivencia, sin embargo de un 25 a un 30% de las pacientes morirán a causa de esta enfermedad. El cáncer es el resultado de la combinación de muchos factores que incluyen mutaciones o polimorfismos de genes de susceptibilidad, agentes ambientales que influyen la adquisición de cambios genéticos somáticos y varios factores sistémicos y locales. Un 10% de los cánceres de mama son atribuibles a mutaciones hereditarias en genes de susceptibilidad, dos de los cuales presentan una alta penetrancia (BCRA 1 y 2). Hay evidencias de la existencia de muchos otros genes implicados, con menor penetrancia y prevalencia que los anteriores. La mayoría de los casos de cáncer (90%) de mama son esporádicos, sin historia familiar previa y sus bases moleculares son complejas (23). Una vez que la paciente presenta la enfermedad, la clasificación y estadiaje del tumor se realiza atendiendo a la morfología, histología, ganglios linfáticos y marcadores asociados al curso clínico del tumor. Sin embargo existe una variabilidad en el pronóstico del paciente que no es predecible por la actual clasificación de los estadios del CA de mama. Esta variabilidad también afecta a la respuesta de la enfermedad a las distintas pautas de tratamiento.

○ ¿Son todos los tipos histológicos y estadios la misma enfermedad? ¿Cómo abordar esta diferenciación con la tecnología disponible?

Una aproximación es el estudio de la expresión de proteínas en los distintos tipos celulares (proteómica de las células tumorales), pero otra forma de aproximación sería estudiar las diferencias en los precursores proteicos, que son en realidad los ARN mensajeros cuya traducción da lugar a las proteínas, es decir realizar el estudio en el nivel de transcripción en vez del nivel de traducción. Van't Veer y cols (24) publicó recientemente la aplicación de la tecnología de los microarray⁶ de ADN al estudio del cáncer de mama, buscando marcadores de pronóstico de la enfermedad (supervivencia a 5 años, metástasis a distancia). Los "arrays" son matrices bidimensionales constituidas por un número de muestras de ADN que se fijan a una superficie sólida. Cada muestra o punto de ADN depositado en el soporte ocupa un espacio menor de 200 µM de diámetro, de forma que un solo "array" puede contener cientos o miles de puntos de ADN (25).

⁶ T14 Plataformas de diagnóstico molecular y génico, basadas en oligos o cDNAs y proteínas o anticuerpos monoclonales (ej. Biochips), para diagnóstico clínico y predictivo.

Generalmente, cuando se maneja un orden de miles, se denominan "microarray". Los puntos de ADN se seleccionan en función de los genes que se quieren estudiar. La miniaturización facilita el estudio simultáneo de miles de reacciones biológicas, que consisten en enfrentar ARN mensajeros de las muestras patológicas y de referencia, previamente amplificados y marcados con fluorescencia, con los ADN del array. Se establece, finalmente una reacción de hibridación competitiva (muestra patológica vs. muestra de referencia) que da lugar a una señal fluorescente que es captada e interpretada automáticamente (26).

En el estudio de Van't Veer se analizaron conjuntamente 25.000 puntos de ADN que contenían una representación de 25.000 genes humanos, cruzados con un total de 98 ARN procedentes de material tumoral de 98 cánceres de mama, cuyo estadíaje y pronóstico del paciente estaban perfectamente recogidos y documentados.

El tratamiento matemático de la ingente cantidad de información generada requiere de aplicaciones informáticas específicas (Bioinformática) y de esta forma, en este estudio se seleccionaron 5.000 genes que aportaban información significativa sobre los tumores testados. A su vez, la aplicación de métodos matemáticos de clasificación de la información, identificó finalmente un grupo de 70 genes cuya expresión se correlacionaba con el pronóstico tumoral. Las diferencias que se detectan en la hibridación de los genes del array según cada muestra de material tumoral ensayado, es lo que define el panel de expresión asignado a cada tumor y por tanto a su pronóstico. La realización de un array de 70 genes sobre el material tumoral de una paciente puede predecir el pronóstico de pacientes con CA mama (ganglios negativos) con mayor eficacia que las clasificaciones utilizadas hasta ahora.

Esta es la gran aportación de esta tecnología: definir paneles de expresión génica que permitan la clasificación de las enfermedades en relación a su pronóstico y a la eficacia de los tratamientos, lo que puede modificar las pautas actuales de terapia oncológica, minimizando los efectos adversos.

Uno de los genes relevantes en el CA mama avanzado es el denominado HER2/neu; erbB2, la sobreexpresión de este gen se produce en un 30% de los casos y está asociado a mal pronóstico. La biotecnología ha permitido desarrollar un anticuerpo monoclonal⁷ dirigido contra el producto de expresión de este gen que está ensayándose en la actualidad (trastuzumab) (27).

Hoy en día, se disponen de procedimientos biotecnológicos que permiten producir cantidades ilimitadas de anticuerpos (Ac) con una sola especificidad derivados de un solo clon de linfocitos B, denominados anticuerpos monoclonales (Acm). La obtención de Acm ha constituido uno de los hitos más relevantes de la inmunología moderna, de enorme repercusión no sólo en el área de la experimentación básica, sino también en el campo de la investigación clínica con finalidad diagnóstica y terapéutica. La utilidad como agentes quimioterápicos estriba en su enorme afinidad por la proteína específica contra la que se dirige y su propiedad efectora, sin embargo el diseño de estos fármacos no esta exento de problemas. Los Acm frecuentemente son específicos de especie y los estudios pre-clínicos de toxicología y eficacia no se pueden realizar siempre de la misma forma que para moléculas pequeñas u otros fármacos. Algunos ensayos clínicos con Acm han demostrado que son inmunogénicos (inducen una respuesta inmune frente a ellos) desconociéndose cómo puede afectar a largo plazo a las propiedades terapéuticas; por otro lado para demostrar la eficacia en clínica de la mayoría de los Acm, se necesita realizar ensayos clínicos a largo plazo ya que las terapias a corto plazo pueden inducir tolerancia a largo plazo. Las inversiones en el campo del desarrollo/aplicación de los Acm se han visto limitadas debido a los fallos iniciales, pero la disponibilidad de estas moléculas en distintos campos clínicos está generando expectativas: en reumatología, para el tratamiento de la Artritis Reumatoide, como antiTNF (Remicade, Infliximab), en hematología, para el Linfoma no Hodgkin (Rituximab), en Transplantes, para inactivar el receptor de la IL-2 (Daclisimab), etc.

⁷ Desarrollo de quimioterápicos y anticuerpos monoclonales contra enfermedades no conquistadas y modulación de respuesta inmune.

○ La reparación/sustitución de tejidos y órganos vista en perspectiva

Los primeros intentos de generar materiales sustitutivos que pudieran desempeñar funciones de tejidos y órganos humanos han venido a surgir para solventar necesidades de tratamiento quirúrgico: como ejemplo, las prótesis de cadera o rodilla, o más recientemente las lentes intraoculares sustitutivas de cristalino, las prótesis aórticas con materiales como el Dacron o el ePTFE, o las prótesis valvulares cardíacas (mecánicas o biológicas, tratadas estas últimas con glutaraldehído para disminuir su inmunogenicidad). La generación de prótesis cada vez más funcionales que permitan el control voluntario de unas cada vez mayores posibilidades de movimiento está generando importantes expectativas en el campo de la ortopedia: el desarrollo de biochips que procesan los impulsos nerviosos procedentes del cerebro traduciéndolos en movimiento de la prótesis es un campo de plena actualidad.

Si bien la investigación sobre materiales biocompatibles sigue su curso con la aparición de nuevas opciones como las cerámicas en traumatología o el titanio en cirugía maxilofacial, ocupando el desarrollo de estos nuevos materiales un lugar prominente para la consecución de nuevas terapias en ortopedia, cirugía reconstructiva, etc., las necesidades de órganos y tejidos que existen actualmente para trasplante han hecho que se planteen nuevos retos.

Se conoce como ingeniería tisular⁸ al área científica interdisciplinaria cuyo fundamento esencial es el uso de células vivas, manipulación del entorno extracelular, creación de sustitutos biológicos y su posterior implantación en el cuerpo, con la intención de reparar, reemplazar, mantener o mejorar la función particular de un órgano o tejidos.

Son 4 los campos desde los que se aborda el tema: trasplantes, injertos autólogos, prótesis y regeneración tisular (28).

La escasez de órganos provenientes de donantes ha impulsado la búsqueda de alternativas; el intento en fechas anteriores de transplantar órganos procedentes de animales emparentados filogenéticamente con el hombre (babuinos, macacos) no ha presentado buenos resultados, requiriendo dosis de inmunosupresión importantes. Algunas de las soluciones planteadas pasan por generar animales transgénicos "humanizados". Ya se han conseguido animales modificados genéticamente que secretan principios activos humanos (vacas cuya leche contiene hormona del crecimiento); el objetivo siguiente sería conseguir animales con órganos completos humanizados (o por lo menos con determinantes antigénicos humanos). Esto nos permitiría generar cantidades "ilimitadas" del órgano o tejido deseado, pero siempre quedaría la duda de la transmisión interespecie de enfermedades animales. Por otra parte, se siguen produciendo avances en el trasplante alogénico de órganos: el trasplante de islotes pancreáticos ha llamado recientemente la atención por sus buenos resultados en el control de la Diabetes, (como muestra el exitoso trasplante realizado recientemente en el Hospital Carlos Haya de Málaga dentro del protocolo de Edmonton), pero el limitado número de órganos hace que sea una técnica no extensible a todos los pacientes. El desarrollo de microcápsulas que permiten el paso de nutrientes pero no de células inmunológicas se prevé como importante en el caso de estos trasplantes celulares (células beta del páncreas en el caso de la diabetes, hepatocitos en caso de insuficiencia hepática, células cromafines para tratamiento del dolor crónico, etc). Existen intentos de expresar proteínas antiangiogénicas contra el cáncer (endostatina) en células inmovilizadas en matrices de alginato.

Los protocolos de inmunosupresión son cada vez más eficaces en controlar el rechazo, pero el factor limitante es, de nuevo, el número de donantes disponibles. Para atender a estas necesidades se está intentando generar tejidos en el propio laboratorio. Las investigaciones del Dr. Jorcano en la generación de piel a partir de cultivo en laboratorio (29) o el trabajo del Dr. Ávila en el campo de la regeneración axonal en ratas mediante el trasplante de células de la glía olfatoria (30) son ejemplo de generación in vitro de tejidos. En este sentido profundizar en el conocimiento sobre los factores tróficos que guían el desarrollo de órganos y tejidos será clave (factores tróficos como guía para regeneración de vías nerviosas como ejemplo). Otra forma de abordaje de la generación de tejidos es a partir de polímeros biocompatibles que sirven de "matriz" extracelular para

⁸ T6 Ingeniería de células y tejidos.

el sostén y crecimiento de las células, polímeros que son biodegradables. Un ejemplo es el desarrollo de válvulas cardíacas mediante cultivo de células endoteliales y miofibroblastos sobre polímeros de ácido poliglicólico en ovejas o los intentos de generación de neointestino. En el caso del hígado se han probado los denominados biorreactores hepáticos (membranas multiperforadas sembradas con hepatocitos) (28).

El Instituto Tecnológico de Massachussets (MIT) ha desarrollado algo parecido a un hígado artificial: usando una técnica de impresión en tres dimensiones (3DP) originalmente pensada para piezas metálicas, este equipo logró estructuras compuestas de varias láminas de polímero (poliláctido y poliglicólido) que contenían canales internos de 300 micrometros. Los investigadores sembraron esta matriz con células endoteliales y de hígado de rata, y perfundieron medio nutritivo durante 5 semanas, con lo que lograron que las células se organizaran en estructuras microscópicas semejantes a las del hígado, y que produjeran albúmina.

Es importante para el éxito del desarrollo de un nuevo órgano o tejido la consecución de un aporte vascular adecuado: las terapias basadas en factores de que inducen neoangiogénesis (VEGF) van en esa dirección (31).

Finalmente, citaremos 2 ejemplos de tejidos artificiales que han sido aprobados en EEUU para uso clínico (derivados de piel y cartílago): El Apligraf de la empresa Organogenesis consta de dermis y epidermis, y se ha aprobado para tratar úlceras de piernas que no curan espontáneamente, como las de los diabéticos. Consta de una capa de células dérmicas y epidérmicas obtenidas a partir del prepucio de neonatos. Carticel, de Genzyme Corporation, se ha aprobado para reemplazar cartílago dañado de la rodilla. A partir de condrocitos del paciente que crecen en una matriz biodegradable, implantándose en la rodilla del enfermo.

Otra forma de obtener tejidos y órganos in vitro en investigación, es a partir de la diferenciación controlada de células pluripotenciales⁹. Se denominan células pluripotenciales las células indiferenciadas que son capaces de diferenciarse en distintos tejidos u órganos. Existen varios tipos de células dependiendo de su capacidad de regeneración: células totipotentes, porque pueden dar lugar a un ser completo, que derivan tras la fecundación del óvulo, del cigoto o de los primeros estadios de 2 a 4 células y se denominan así porque pueden dar lugar una de ellas a un ser completo. El cigoto tras varios ciclos de división celular da lugar al blastocisto que se diferencia a trofoblasto que constituyen la placenta y la masa interna de células que dará lugar al embrión. De ellas se generan las células madres pluripotentes que se obtienen de la masa interna celular del blastocisto antes de su preimplantación y tienen virtualmente una capacidad ilimitada de replicación y pueden dar lugar a cualquier tipo celular del organismo. Estas células de la masa celular se pueden aislar y bajo condiciones apropiadas expandidas en cultivos "in vitro" y constituyen células madre embrionarias (ESC). Las células de las gónadas se pueden aislar en tiempos posteriores del desarrollo y también dar lugar a células pluripotenciales, que se pueden diferenciar a cualquier linaje celular del cuerpo. Las células madre intermedias (y aquellas que se aíslan de tejidos de adultos) están restringidas en el linaje celular de un órgano particular y se llaman pluripotenciales porque son capaces de dar lugar a ciertos tipos celulares pero no a todos.

Desde el punto de vista de su localización se dividen en células madre embrionarias o de adultas. La selección de uno u otro tipo tiene aparte de sus evidentes cuestiones éticas otros aspectos más científicos. ¿Cuál es la fuente óptima? ¿La plasticidad es una propiedad de las células madre adultas? ¿Esta plasticidad realmente representa una opción terapéutica? ¿Qué enfermedades tienen más posibilidades de ser tratadas/curadas con estas células? ¿Cuál es el método científico y clínico correcto para establecer una base sólida de esta terapia? (32,33).

En el adulto las células pluripotenciales permanecen en ciertas localizaciones durante toda la vida. Así, se han descrito de estas células pluripotenciales: hematopoyéticas, células de estroma en la médula ósea, neuronales, epidermales, de músculo esquelético y en menor medida de otros tejidos. Sin embargo, está en discusión si son multipotentes y dan lugar a varios tipos celulares diferentes del tejido en el que se encuentran; hay evidencias de que en ciertas condiciones "in vitro", no sólo las ESC, sino también las células

⁹ T12 Diferenciación controlada y transdiferenciación de células pluripotenciales para su uso in vivo en diferentes terapias.

multipotenciales de adulto tienen capacidad de adoptar diferentes linajes celulares de diferentes tejidos (34). Si estos resultados se confirmaran permitirían utilizarlas como fuente alternativa a las ESC solventando los problemas éticos y legales que plantean estos últimos. El conocimiento de las citocinas y factores de crecimiento que permiten la expansión y diferenciación o transdiferenciación de las ESC podrá facilitar en el futuro el acceso del paciente a sus células autólogas con lo que se evitarían los posibles problemas de rechazo del trasplante celular.

En cualquier caso ya existen ciertas evidencias clínicas del uso de estos últimos en terapia. Por ejemplo, por primera vez en España, se realizó una implantación de células pluripotenciales de médula ósea para la regeneración de tejido cardíaco a un paciente de 66 años con infarto agudo de miocardio, con la implicación de un grupo interdisciplinar de médicos y científicos.

En los tejidos que regeneran activamente sus células madre no como las células sanguíneas, no tiene demasiado interés este tipo de terapias, ya que el propio órgano puede repararse rápidamente. Es por ello que aquellas enfermedades que tienen su origen en un defecto intrínseco de una población madre pluripotencial, se ha obtenido éxito terapéutico (por ejemplo, trasplante de médula ósea en el Síndrome de Fanconi). En aquellos casos de un agente externo que los destruye o altera, esta terapia es efectiva si se neutraliza el agente dañino (por ejemplo, BHT y anemia falciforme, asociada a inmunosupresión de la respuesta autoinmune que causa la patología) (diabetes tipo I y trasplante de islotes). Sin embargo, existen tejidos que no se reemplazan de modo general en el adulto (aunque puede haber excepciones son poco significativas): corazón, sistema nervioso, riñones y pulmones. Estos tejidos tienen limitada capacidad de regeneración bajo condiciones fisiológicas normales en el adulto. Cuando se dañan se observa una pérdida irreversible de su función. Es en estos casos donde existe más debate sobre si: 1) con células embrionarias pueden solucionarse el problema y 2) si las células madre de otros tejidos adultos pueden transdiferenciar y reparar esos tejidos. Existen casos descritos en España de regeneración tras infartos con células madre hematopoyéticas aunque ha sido criticado si se debe a un efecto de transdiferenciación real o que estas células favorecen la fusión de los cardiomiocitos.

Aunque se conozcan y se puedan aislar las células madre, existen otros problemas físicos como la correcta localización o nicho en el que se tienen que alojar, por ejemplo es difícil restaurar con células madre epiteliales el tejido dañado en quemados porque las células no tienen el soporte físico y químico adecuado. Otro problema de difícil solución es la extensión física del daño. Uno de los potenciales problemas que más preocupa y hay que tener en cuenta en la utilización de las células madre es la posibilidad de aparición de tumores. Dada la alta capacidad replicativa de estas células, es posible, aunque no muy probable, que puedan dar lugar a una replicación continua y generar un tumor (35).

En resumen, los próximos años nos traerán sin duda grandes avances en este campo de las células pluripotenciales a nivel molecular. Ello permitirá identificar los genes implicados en la autorenovación, perpetuación y diferenciación. De modo análogo, los genes implicados en la reprogramación celular de células adultas serán identificados para poder convertirse en otro tipo celular. Como se puede deducir de la lectura de estas líneas, las posibilidades son muchas, pero habrá que decantarse por las que sean más factibles de ser aplicadas en los pacientes, todo sobre un fondo de debate ético según el cual habrá que valorar la balanza riesgo-beneficio de su aplicación.

○ Bibliografía

1. Vivanco, F.; López-Bescos, L.; Tunon, J.; Egido, J.: [Proteomics and cardiovascular disease]. *Rev ESP Cardiol* 2003; 56(3):289-302.
2. Hardy, J.; Allsop, D.: Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12(10):383-8.
3. Ghiso, J.; Frangione, B.: Amyloidosis and Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54(12):1539-51.
4. Citron, M.: Emerging Alzheimer's disease therapies: inhibition of beta-secretase. *Neurobiol Aging* 2002; 23(6):1017-22.
5. Hong, L.; Koelsch, G.; Lin, X.; Wu, S.; Terzyan, S.; Ghosh, A. K.; *et al.*: Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor. *Science* 2000; 290(5489):150-3.
6. Nebert, D. W.; Dalton, T. P.; Stuart, G. W.; Carvan, M. J.: 3rd. "Gene-swap knock-in" cassette in mice to study allelic differences in human genes. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 919:148-70.
7. D'Orleans-Juste, P.; Honore, J. C.; Carrier, E.; Labonte, J.: Cardiovascular diseases: new insights from knockout mice. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3(2):181-5.
8. Anagnostopoulos AV. It's a knockout! Male infertility and neuropathology. *Trends Genet* 2002; 18(1):8-10.
9. Larsson, N. G.; Rustin, P.: Animal models for respiratory chain disease. *Trends Mol Med* 2001; 7(12):578-81.
10. Palella, F. J. Jr.; Delaney, K. M.; Moorman, A. C.; Loveless, M. O.; Fuhrer, J.; Satten, G. A.; *et al.*: Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998; 338(13):853-60.
11. Resino, S.; Bellon, J. M.; Sánchez-Ramón, S.; Gurbindo, D.; Ruiz-Contreras, J.; Leon, J. A.; *et al.*: Impact of antiretroviral protocols on dynamics of AIDS progression markers. *Arch Dis Child* 2002; 86(2):119-24.
12. Finzi, D.; Blankson, J.; Siliciano, J. D.; Margolick, J. B.; Chadwick, K.; Pierson, T.; *et al.*: Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 1999; 5(5):512-7.
13. Kasschau, K. D.; Carrington, J. C.: A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 1998; 95(4):461-70.
14. Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391(6669):806-11.
15. Coburn, G. A.; Cullen, B. R.: Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J Virol* 2002; 76(18):9225-31.
16. Novina, C. D.; Murray, M. F.; Dykxhoorn, D. M.; Beresford, P. J.; Riess, J.; Lee, S. K.; *et al.*: siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* 2002; 8(7):681-6.
17. Martínez, M. A.; Gutiérrez, A.; Armand-Ugon, M.; Blanco, J.; Parera, M.; Gómez, J.; *et al.*: Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication. *Aids* 2002; 16(18):2385-90.
18. Hacein-Bey-Abina, S.; von Kalle, C.; Schmidt, M.; Le Deist, F.; Wulffraat, N.; McIntyre, E.; *et al.*: A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003; 348(3):255-6.
19. McLachlan, G.; Stevenson, B. J.; Davidson, D. J.; Porteous, D. J.: Bacterial DNA is implicated in the inflammatory response to delivery of DNA/DOTAP to mouse lungs. *Gene Ther* 2000; 7(5):384-92.
20. Bielinska, A.; Kukowska-Latallo, J. F.; Johnson, J.; Tomalia, D. A.; Baker, J. R. Jr.: Regulation of in vitro gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Res* 1996; 24(11):2176-82.
21. Belousova, N.; Korokhov, N.; Krendelshchikova, V.; Simonenko, V.; Mikheeva, G.; Triozzi, P. L.; *et al.*: Genetically targeted adenovirus vector directed to CD40-expressing cells. *J Virol* 2003; 77(21):11367-77.



22. Nguyen, T. H.; Loux, N.; Dagher, I.; Vons, C.; Carey, K.; Briand, P.; *et al.*: Improved gene transfer selectivity to hepatocarcinoma cells by retrovirus vector displaying single-chain variable fragment antibody against c-Met. *Cancer Gene Ther* 2003;10(11):840-9.
23. Sakorafas, G. H.: The management of women at high risk for the development of breast cancer: risk estimation and preventative strategies. *Cancer Treat Rev* 2003; 29(2):79-89.
24. Van't Veer, L. J.; Dai, H.; van de Vijver, M. J.; He, Y. D.; Hart, A. A.; Mao, M.; *et al.*: Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415(6871):530-6.
25. Ramsay, G.: DNA chips: state-of-the art. *Nat Biotechnol* 1998; 16(1):40-4.
26. Desai, K. V.; Kavanaugh, C. J.; Calvo, A.; Green, J. E.: Chipping away at breast cancer: insights from microarray studies of human and mouse mammary cancer. *Endocr Relat Cancer* 2002; 9(4):207-20.
27. Hudziak, R. M.; Lewis, G. D.; Winget, M.; Fendly, B. M.; Shepard, H. M.; Ullrich, A.: p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 1989; 9(3):1165-72.
28. Falke, G. F.; Atala, A.: Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch Arg Ped* 2000;98(2):103.
29. Del Rio, M.; Larcher, F.; Serrano, F.; Meana, A.; Munoz, M.; García, M.; *et al.*: A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin in vivo. *Hum Gene Ther* 2002; 13(8):959-68.
30. Moreno-Flores, M. T.; Lim, F.; Martín-Bermejo, M. J.; Díaz-Nido, J.; Ávila, J.; Wandosell, F.: Immortalized olfactory ensheathing glia promote axonal regeneration of rat retinal ganglion neurons. *J Neurochem* 2003; 85(4):861-71.
31. Rio, M. D.; Larcher, F.; Meana, A.; Segovia, J.; Álvarez, A.; Jorcano, J.: Nonviral transfer of genes to pig primary keratinocytes. Induction of angiogenesis by composite grafts of modified keratinocytes overexpressing VEGF driven by a keratin promoter. *Gene Ther* 1999; 6(10):1734-41.
32. Keller, R.: Stem cells on the way to restorative medicine. *Immunol Lett* 2002; 83(1):1-12.
33. Daley, G. Q.: Prospects for stem cell therapeutics: myths and medicines. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12(5):607-13.
34. Anderson, D. J.; Gage, F. H.; Weissman, I. L.: Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med* 2001; 7(4):393-5.
35. Brickman, J. M.; Burdon, T. G.: Pluripotency and tumorigenicity. *Nat Genet* 2002; 32(4):557-8.

Capítulo VI:

Conceptos y futuras aplicaciones de la Genómica, Proteómica y Bioinformática en el campo de la salud

Autores:

Mariano Esteban Rodríguez

- Doctor en Farmacia. Licenciado en Ciencias Biológicas. Director del Centro Nacional de Biotecnología.

Ángel Zaballos Sanz

- Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Madrid. Responsable de la Unidad de Genómica del Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología.

Juan Pablo Albar Ramírez

- Doctor en Inmunología, Universidad Complutense de Madrid. Jefe de la Unidad de Proteómica, Centro Nacional de Biotecnología e Investigador del Centro Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.

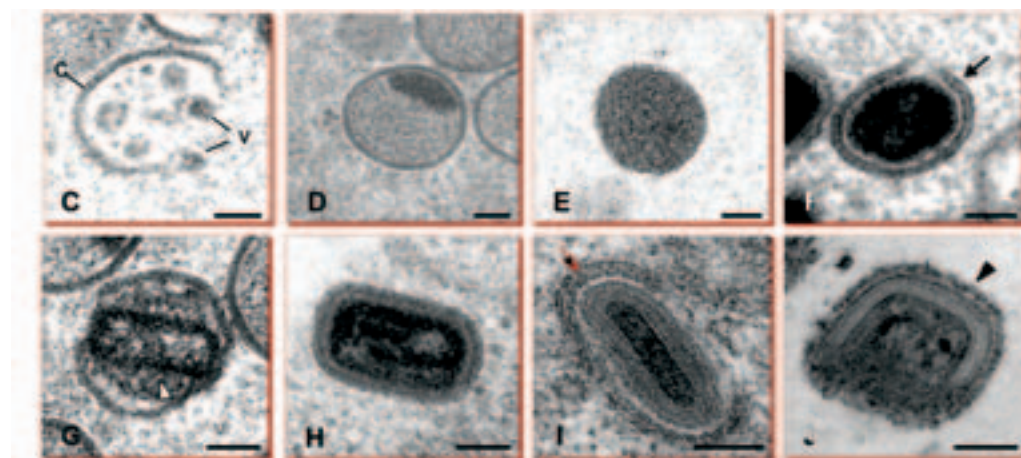
Alfonso Valencia Herrera

- Doctor en Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid. Director del grupo de Diseño de Proteínas del Centro Nacional de Biotecnología.

Conceptos y futuras aplicaciones de la genómica proteómica y bioinformática en el campo de la salud

Los avances espectaculares de los métodos bioinformáticos junto con las tecnologías genómica y proteómica que se describen en este capítulo, han puesto de manifiesto que es posible abordar el complejo funcionamiento de nuestros genes y sus consecuencias para el crecimiento normal o anormal de las células que componen los tejidos de un organismo. La pregunta de si la secuenciación completa del genoma humano supone que vamos a conocer rápidamente cómo funcionan nuestros genes, debido a su limitado número (con anterioridad a la secuenciación del genoma se estimaron unos 100.000 genes, luego después de la secuenciación este número se redujo a 40.000 genes y actualmente después del refinamiento de la secuencia dicho número se considera estar entre 20.000 a 30.000 genes), parece que no es tal cual y que va a llevar muchos años en elucidar la funcionalidad de todos nuestros genes. Este reducido número es más aparente que real, ya que muchos genes se expresan en diferentes formas, por lo que en lugar de hablar de un gen único, esta misma unidad transcripcional puede dar lugar a 4-5 formas distintas, y entonces tendríamos que hablar de unos 100.000-150.000 genes funcionales. Además, si consideramos que el producto del gen, la proteína, sufre cambios después de su síntesis (como se indica en el apartado de Proteómica), el número de proteínas funcionales en las células puede sobrepasar el millón. Esto nos da una idea de la complejidad que existe para entender el funcionamiento de los genes humanos. Gracias a las tecnologías genómica-proteómica y al análisis bioinformático, podemos con los datos obtenidos abordar el conocimiento de cómo funciona una célula en su contexto individual y avanzar hacia el funcionamiento de un tejido y eventualmente de un organismo. Así, se han ido identificando por la tecnología genómica, genes que se inducen selectivamente durante el crecimiento de células normales, en procesos tumorales, en trastornos cardiovasculares y neurodegenerativos, en procesos infecciosos y en otras patologías. La proteómica está identificando las distintas proteínas que intervienen en estos procesos y los complejos proteicos y la bioinformática pone orden cognitivo en la información acumulada. Existe una necesidad en establecer bases de datos internacionales donde se pueda incorporar la continua información aportada por los grupos de investigación y uniformar los datos. Ya se están haciendo avances en esta dirección como se indica en el apartado sobre bioinformática.

Pongamos un ejemplo del abordaje de las técnicas genómicas para elucidar los genes celulares que se activan o reprimen durante un proceso infeccioso. Como ejemplo, podemos considerar la infección de células humanas por el virus que fue utilizado para erradicar la enfermedad más devastadora que ha padecido la humanidad, la viruela. En nuestro laboratorio del Centro Nacional de Biotecnología y en estrecha colaboración con los grupos de Genómica y Bioinformática del CNB, hemos identificado por "chips" de cDNA en portas conteniendo 15.000 genes humanos (ver el apartado de Genómica para entender cómo se preparan y procesan los "chips"), aquellos que se inducen en respuesta a la infección, así como aquellos otros que se inactivan a lo largo del proceso infeccioso. En la Figura 1 se ilustra la morfología del virus vaccinia y una célula infectada. Es de reseñar la compleja estructura del virion maduro (250-310 nm), con una doble membrana externa que engloba al nucleóide que contiene una molécula de DNA de cadena doble y que codifica para unos 200 genes virales.



Se puede observar cómo la célula se convierte en factoría para producir progenie vírica. Esta capacidad del virus para replicar en el interior de la célula va acompañada de una fuerte respuesta celular, por inducción de genes específicos, alguno de los cuales el virus va a utilizar en beneficio propio y otros van a tratar de contrarrestar el proceso infeccioso. Hemos observado que durante la infección por el virus vaccinia un porcentaje elevado de los genes celulares reprime su síntesis y sólo un número más reducido de genes aumenta su expresión.

En la Tabla 1 se agrupan en un "cluster" genes celulares que se inducen en respuesta a la infección ("un cluster" es un grupo de genes con un patrón de transcripción similar en el tiempo). En otros seis "cluster" se incluyen genes que se activan o reprimen diferencialmente durante la infección (1). Dentro de la Tabla 1 se incluyen también aquellos genes sin función asignada en las bases de datos (ESTs).

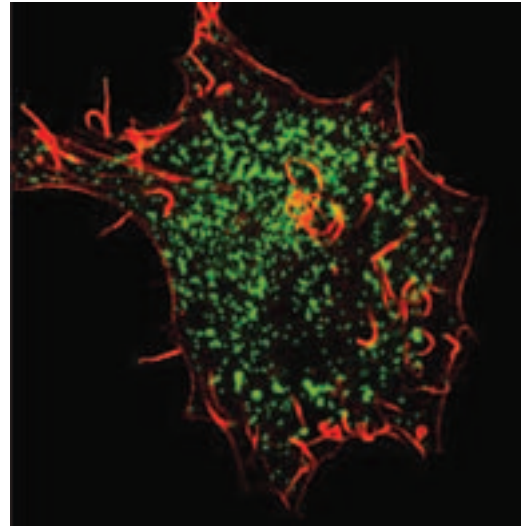
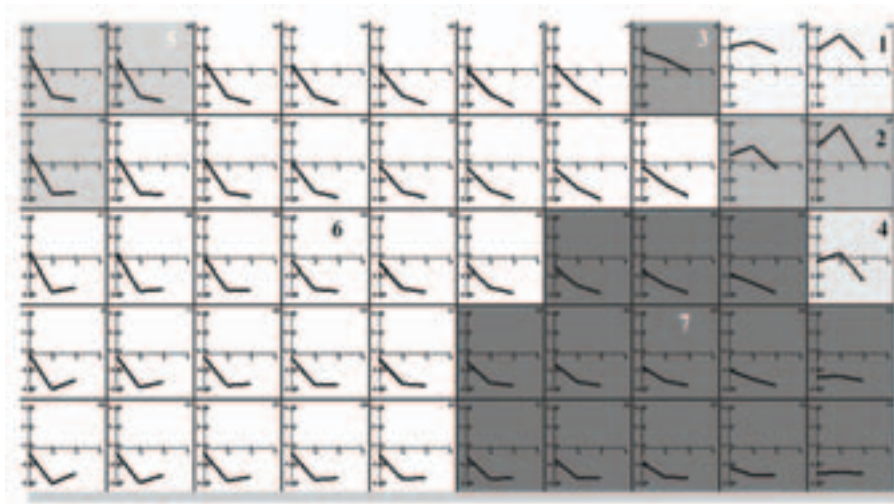


Figura 1. Morfología del virus vaccinia y progenie viral en una célula infectada.



FUNCTION AND GENE	Accessio Fold		Fold	Fold. Change
	Numb	At 2	At 6	16
WAS protein familymember	N5985	2,3	2,4	2,9
KIAA0136	N7363	3,9	4,2	3,8
Diacylglycerol kinase delta (130kD)	AA28069	1,6	2,4	2,5
KIAA0671 gene	R3301	1,3	1,8	2,2
Claudin 3	AA03932	1,7	2,1	2,ç3
Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2	N6394	2,0	2,1	1,8
Thymosin beta 4 X chromosome	AA63410	3,8	5,7	2,9
Adenosine A2a receptor	N5755	3,8	4,1	4,1
PRO2047	N6620	2,2	2,7	1,7
Glutamate decarboxylase 2 (pancreatic islets and brain, 65kD),	R4400	3,5	2,3	3,1
Golgi resident protein	AA25595	1,4	2,0	1,7
CD80 antigen (CD28 antigen ligand 1, B7-1 antigen),	AA98381	1,7	2,5	2,0
KIAA0888	AI37611	4,6	16,2	22,7
Homo sapiens normal mucosa of esophagus specific 1 (NMES1) mRNA,	AA62099	1,6	2,5	1,2
Selenophosphate synthetase,	AA48808	3,7	7,1	2,1
Prostaglandin-endoperoxide synthase 1,	AA45466	1,5	2,3	1,2
Pericentrin	N4532	3,2	7,1	1,5
Attractin,	AA68350	2,1	2,6	1,4
Melanoma antigen family C 1,	AI12611	1,4	2,0	1,2
ATPase aminophospholipid transporter (APLT) Class I type 8A member 1,	AI21858	1,4	2,6	1,5
EST	T8695	3,6	19,8	9,4
EST	N3489	3,1	5,3	2,8
EST	N4708	5,7	9,0	7,1
EST	N6213	5,7	13,5	3,7
EST	H7899	2,6	11,7	8,2
EST	N4016	3,8	6,8	4,6
EST	N4743	3	5,2	3,1
EST	N6306	3,7	5	3,0
EST	N6468	8,1	10,3	8,6
EST	N6466	2,3	2,5	2,1
EST	AA88461	1,7	1,6	2
EST	AA00513	1,6	5,2	2,2
EST	N6251	2,5	11,0	1,7
EST	N5214	4,5	12,3	1,4
EST	N5913	3,2	5,2	1,7
EST	N5921	3,7	8,8	1,8
EST	N5122	2,8	4,9	1,8

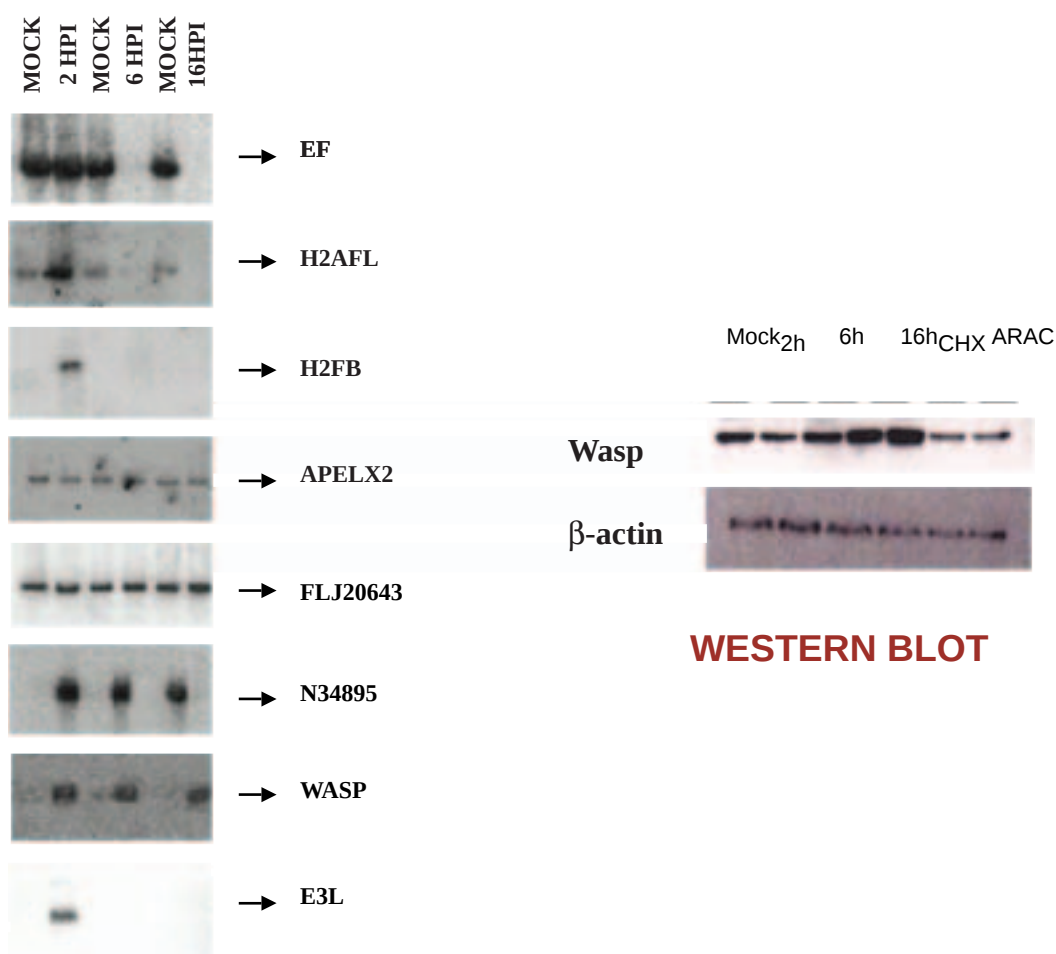
Tabla 1. Ejemplo de una agrupación de genes celulares (cluster) inducidos durante la infección con el virus vaccinia

Aunque estos resultados se han obtenido por la tecnología de "chips", su relevancia tiene que ser confirmada por otras aproximaciones, como son cuantificar los niveles de los RNA mensajeros (RNAm) aislados de las células infectadas por la tecnología de RT-PCR cuantitativa, hibridación por Northern, así como determinar los niveles de proteínas codificadas por los RNAm correspondientes. Estas metodologías son necesarias para confirmar que lo que se observa por chips de cDNA no es artefactual y se correlaciona con los datos obtenidos por otros métodos distintos. En la Tabla 2 se comparan los resultados obtenidos por microarray con los de RT-PCR cuantitativa para varios genes, confirmando por ambas metodologías el aumento o no aumento en la expresión de genes específicos.

	GENE PRODUCT			FOLD CHANGE		
	MICROARRAY			RT-PCR		
	t=2	t=6	t=16	t=2	t=6	t=16
PCNT2	3.20	7.11	1.56	3.82	8.54	2.21
WASF1	2.35	2.43	3.81	2.05	3.30	4.27
IL6 ST	1.02	1.35	0.98	1.08	1.53	1.07

Tabla 2. Validación del análisis de microarray por RT-PCR cuantitativa.

Estos resultados han sido también validados por las técnicas de Northern y Western blot, observándose con el tiempo de infección el aumento en los niveles de expresión de RNAm y de alguna proteínas celulares específicas (los niveles de otros muchos RNAm y proteínas quedan reducidos).



NORTHERN BLOT

Figura 2. Validación del análisis de microarrays por medición de los niveles de RNAm (Northern) y de proteínas (Western blot).

Una vez establecido que los RNAm son específicamente inducidos durante la infección, la siguiente pregunta es definir el papel de estos genes en el proceso infeccioso. Para ello es necesario disponer de otras herramientas que permitan este tipo de abordaje. Una aproximación es utilizar animales a los que se les ha inactivado de forma selectiva el gen de interés y estudiar el significado de dicho gen en la infección. Es de destacar que se han hecho avances muy significativos en distintos centros de investigación, generando una gran variedad de ratones deficientes en numerosos genes que afectan al ciclo celular, sistema inmune, movilidad, sistema nervioso, sensibilidad a infecciones, comportamiento etc. Así, el uso de ratones que tengan inactivados alguno de los genes que se indican en la Tabla 1 puede aportar información relevante durante la infección con el virus vaccinia. Estos experimentos están en marcha en el CNB y hemos podido demostrar que la inducción de alguno de los genes indicados en la Tabla 1 contribuye a facilitar el proceso infeccioso, mientras que otros genes favorecen su disminución.

Estas tecnologías genómicas, combinadas con la proteómica y bioinformática nos están permitiendo definir cómo las células responden a estímulos, como el ejemplo de los virus y su influencia en los tejidos infectados. Así, la genómica aplicada a pacientes con un proceso infeccioso, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus de la hepatitis C (HCV), y sometidos al tratamiento de fármacos (como pueden ser los interferones), nos puede indicar qué tipo de genes se activan en las células afectadas (linfocitos CD4+ en el caso del VIH, o hepatocitos en el caso de HCV) y optimizar el tratamiento en los pacientes (3-5). Es indudable que estas aproximaciones tendrán un gran impacto en la clínica y su uso ayudará a un mejor seguimiento de la enfermedad y a su tratamiento. Es predecible que se establezcan patrones de genes que definan las distintas patologías, aunque habrá diferencias selectivas en función de factores ambientales, alimenticios, edad y género. Cuanto más información obtengamos sobre activación/inactivación selectiva de genes en procesos patológicos, estaremos en mejores condiciones para controlar la evolución de muchas enfermedades. La conjunción de esfuerzos entre los centros de investigación y los hospitales es necesaria para que estas tecnologías se introduzcan en la práctica clínica y se produzca una mayor comunicación entre la investigación básica y la clínica. Es indudable que estos esfuerzos de colaboración van a redundar en una mejora en la práctica clínica, al introducir nuevas tecnologías, y en mejor servicio a los pacientes. En los apartados siguientes se hace una valoración sobre el concepto y aplicación de los procedimientos informáticos y de las nuevas tecnologías genómica y proteómica en el campo de la salud.

○ Bibliografía

1. Guerra, S.; López-Fernández, L. A.; Pascual-Montano, A.; Muñoz, M.; Harshman, K.; Esteban, M. (2003): Cellular gene expression survey of vaccinia virus infection of human HeLa cells. *J. Virol* 77, 6493-6506.
2. Hughes, T. R.; *et al.* (2000): Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell* 102, 109-126.
3. Geiss, G. K.; *et al.* (2001): Large scale monitoring of host gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarrays. *Virology* 266, 8-16.
4. Jones, J.; Arvin, A. M. (2003): Microarray analysis of host gene transcription in response to Varicella-Zoster virus infection of human T cells and fibroblasts in vitro and SCIDhu skin xenografts in vivo. *J. Virol* 77, 1268-1280.
5. García de la Nava, J.; *et al.* (2003): Engene: The processing and exploratory analysis of gene expression data. *Bioinformatics* 19, 657-658.



Genómica

○ Introducción: el genoma y el transcriptoma

Este mismo año se cumplen 50 del descubrimiento de la estructura terciaria del DNA (1), contribución científica que indudablemente marca un hito en las ciencias biomédicas. Desde aquel momento, un hecho manifiesto, como es que la herencia condiciona múltiples aspectos de los seres vivos, empieza a tener una explicación química. A su vez, dos conceptos que la genética vino utilizando desde sus comienzos, tienen en consecuencia una traducción molecular: somos fundamentalmente un vasto conjunto de proteínas, el fenotipo, codificadas por secuencias definidas de ácidos nucleicos, el genotipo. Esta capacidad predictiva de los ácidos nucleicos, que tanto nos pueden informar de cuáles son las proteínas que están actuando en un momento dado, analizando el transcriptoma o conjunto de RNAs expresados, como de todas las posibles que aparecerán a lo largo de la vida de un individuo, analizando el genoma, es una de las principales razones que ha impulsado la caracterización precisa de los genomas de los seres vivos. Con estos preámbulos, la obtención de la secuencia completa del genoma humano era un asunto sobre el que sólo se podía discutir cuándo llegaría, dado que era prácticamente inevitable, además de ser una necesidad y constituir un deseo colectivo de la humanidad. Ni que decir tiene que este, ya más cercano descubrimiento, ha sido el de más relevancia científica y social de los últimos años (2, 3). La secuenciación completa del genoma humano y de otros seres vivos va a permitir, si no lo está haciendo ya, dar respuesta a una pregunta que la ciencia estaba deseosa de plantear: ¿podemos conocer cuáles son los genes de un individuo concreto, cuáles se están expresando en un tejido y momento dados y además cómo se relacionan con un fenotipo dado, pongamos por caso una enfermedad? Para responder a esta pregunta está la Genómica, que más que una disciplina en sí, es un conjunto de técnicas y conocimientos que permiten el análisis de los genomas en su conjunto.

1. Tecnología genómica

Aparte de su expresión fenotípica, aquello que mejor caracteriza un gen es su secuencia de nucleótidos, con lo que su determinación es la manera más fidedigna e inequívoca de identificarlo. Sin embargo, no es una vía fácil para caracterizar simultáneamente los cientos o miles de moléculas de ácido nucleico que componen una muestra compleja biológica. Las técnicas comúnmente usadas por la Genómica hacen uso de otra propiedad de los ácidos nucleicos, también dependiente de la secuencia, como es la capacidad para hibridar y formar dobles hélices debido a la interacción complementaria entre las bases nitrogenadas de sus nucleótidos. Mediante enlaces de hidrógeno entre adenina y timina por un lado, y guanina y citosina por el otro, las cadenas de ácidos nucleicos se emparejan de forma estable, pero reversible. En el laboratorio se controla que estas interacciones se produzcan en condiciones muy estrictas, y con unas pocas decenas de bases de una secuencia o gen dado, es posible identificarlo con escaso margen para la duda. A modo de ejemplo, cualquier secuencia al azar de veinte nucleótidos aparecería con una frecuencia de una vez por cada billón de bases, o sea, el equivalente a 300 genomas humanos.

Para detectar esa hibridación específica se usan moléculas con algún tipo de marca identificable por métodos físicos o químicos. Tradicionalmente se han venido usando elementos radiactivos, pero en la actualidad se usan mayoritariamente moléculas fluorescentes, que pueden acoplarse química o enzimáticamente a los ácidos nucleicos que serán después usados como sondas. En cualquier caso, la detección de radiactividad o luz será síntoma de hibridación y por tanto de detección de una secuencia específica dada, mientras que la intensidad de esas radiaciones informará de la cantidad relativa de cada secuencia en la muestra.

Desde la década de los 80, se ha venido analizando la estructura de los genes y su expresión de manera individualizada. Sin embargo, el estudio de los sistemas biológicos en la escala genómica ha venido de la mano de dos logros. En primer lugar, la secuenciación de genomas completos, tal como se indicó más arriba. En segundo lugar, la miniaturización, que ha permitido situar en los escasos centímetros cuadrados de un portaobjetos de microscopio, en posiciones definidas y discretas, hasta cientos de miles

de fragmentos de DNA con una secuencia concreta, para así obtener los llamados *microarrays* o *chips* de DNA.

El diseño y la fabricación de los *microarrays de DNA* dependen en primera instancia del ácido nucleico que posteriormente se vaya a estudiar. En cualquier caso, el conocimiento más o menos detallado del genoma o del transcriptoma es un requisito casi ineludible. El análisis del transcriptoma tiene como objetivo determinar qué genes son activos y en qué medida. En la práctica se lleva a cabo sobre dos tipos de *chips*: aquellos en los que se inmovilizan fragmentos de cDNAs procedentes de colecciones de clones (genotecas), y aquellos en los que se inmovilizan pequeños fragmentos de DNA sintetizados químicamente (oligonucleótidos), específicos para cada gen expresado (Figura 1). Actualmente y dada su homogeneidad, reproducibilidad y robustez, los *microarrays* de oligonucleótidos son los más usados, destacando los *chips* de alta densidad de la compañía Affymetrix, que con sus más de 500.000 oligonucleótidos permiten analizar simultáneamente la expresión de más de 20.000 genes. En este caso, para cada gen se sintetizan *in situ* dos series de oligonucleótidos, unos que aparean perfectamente con la secuencia a identificar y otros que difieren en tan sólo una posición, con los que se controla la especificidad de la hibridación. En otros *chips*, como los de Agilent y Roche, se sintetizan oligonucleótidos más largos, con lo que con uno o dos de ellos es suficiente para identificar sin ambigüedad cada gen. El análisis del genoma persigue un objetivo distinto, pues trata de averiguar qué versiones o alelos de los distintos genes tiene un sujeto determinado. En este caso también se utilizan *chips* de oligonucleótidos sintéticos de manera casi exclusiva y Affymetrix es de nuevo el referente en este capítulo, con *chips* que permiten analizar 10000 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en un único experimento.

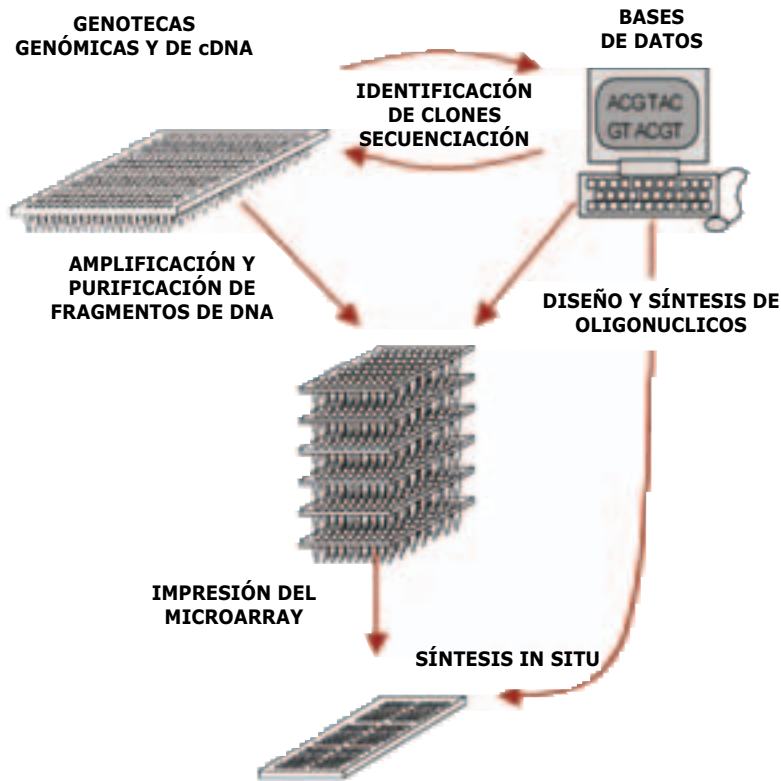


Figura 1. Construcción de *microarrays* o *chips* de DNA. La caracterización total o parcial del genoma o del transcriptoma de un determinado organismo es esencial para la construcción de *microarrays*. La secuenciación de miles de clones procedentes de genotecas de DNA genómico y de cDNA permite identificar los distintos genes de ese organismo. A partir de esa información, almacenada en grandes bases de datos como GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) o EMBL (<http://www.ebi.ac.uk>), se identifican clones representativos de cada uno de los genes. El DNA presente en cada uno de ellos es amplificado mediante PCR y purificado, para ser posteriormente depositado mediante robots de alta precisión sobre soportes de vidrio que constituyen los *chips* de DNA. Alternativamente, a partir de la secuencia de los genes o de los cDNAs se diseñan oligonucleótidos de pequeño tamaño (25-70 residuos) que específicamente hibridan con cada uno de ellos. Los oligonucleótidos son previamente sintetizados antes de inmovilizarlos sobre los soportes o bien sintetizados *in situ* sobre el *chip*. De esta última tecnología cabe destacar, entre otras, la fotolitografía empleada por Affymetrix (<http://www.affymetrix.com>), que usa precursores activables por luz para la adición de los residuos nucleotídicos, la inyección de precursores fosforoamiditos en el caso de Agilent (<http://www.agilent.com>) y la activación de precursores por campo eléctrico que aplica Roche (<http://www.roche-applied-science.com/sis/matrixarray/>).

Sobre estos soportes sólidos tiene lugar la hibridación con el DNA o el RNA objeto de estudio, una vez procesados adecuadamente. El DNA genómico requiere habitualmente una amplificación selectiva de aquellas regiones de interés, de tal manera que por un lado se disminuye el número de secuencias y por otro se aumenta su concentración. En cuanto al RNA, es copiado a DNA mediante la transcriptasa en reverso, obteniéndose el correspondiente cDNA. En ambos casos, el empleo de nucleótidos modificados permitirá el posterior acoplamiento de moléculas fluorescentes tales como Cy3 y Cy5, que emiten luz de distinta longitud de onda una vez excitadas. Además, esto permite el análisis simultáneo de dos muestras en un único *chip* (Figura 2). Así, en los estudios de expresión génica, los cDNA diferencialmente marcados hibridarán con las secuencias complementarias presentes en el *microarray*, y la emisión de fluorescencia identificará los genes que se están expresando, mientras que la intensidad de luz informará acerca de sus niveles de expresión. Para cada punto del *microarray*, la cantidad de fluorescencia de uno y otro color indicará cuanto se expresa el gen correspondiente en una y otra muestra. En conjunto, se obtendrá una serie de valores de intensidad de fluorescencia para cada gen, que constituye el perfil de expresión del órgano, tejido, célula o sistema biológico dado, y que, con los controles adecuados, puede ser comparado con cualquier otro. El análisis de genotipos ofrece un resultado ligeramente distinto, puesto que la pregunta también lo es. Se obtendrán datos de ausencia o presencia de cada una de las posiciones alélicas o SNP que son interrogadas, puesto que los individuos sólo pueden ser homocigotos (para uno u otro alelo) o heterocigotos. Como la diferencia entre los dos alelos de un SNP es de un único nucleótido, la muestra se hibrida en condiciones tales que sólo son estables los híbridos perfectamente apareados. Al final también se obtendrá un perfil genético característico del individuo, que en cualquier caso sólo es un extracto de toda su información genética.

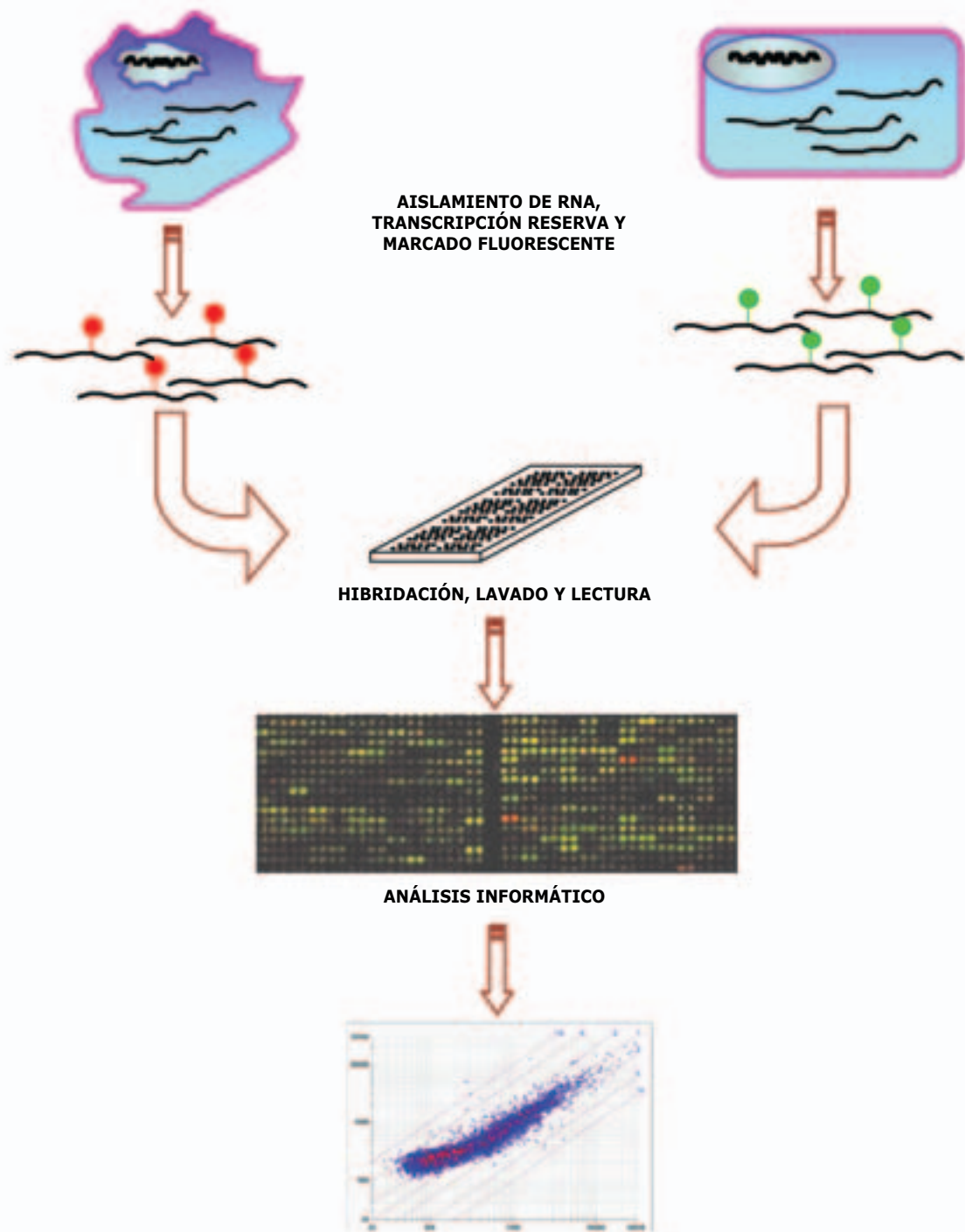


Figura 2. Estudio de perfiles de expresión mediante *microarrays* de DNA. El RNA de las muestras biológicas se aísla siguiendo protocolos habituales y se somete a transcripción reversa para obtener el correspondiente cDNA, que será marcado con moléculas fluorescentes. El empleo de moléculas con distintos espectros de excitación y emisión (como Cy3 en verde y Cy5 en rojo) hace posible que en un mismo *chip* se determine el perfil de expresión de dos muestras distintas. Tras la hibridación y el procesamiento posterior, el *chip* es excitado con luz láser adecuada y la fluorescencia emitida por los dos fluorocromos capturada mediante una cámara CCD. La imagen así obtenida es analizada informáticamente, cuantificándose la emisión de ambos fluorocromos en cada uno de los puntos del *microarray*. Los valores obtenidos se pueden representar en un diagrama X-Y, donde los puntos que se alinean en la diagonal corresponden a genes cuya expresión es similar en las dos muestras, mientras que los que aparecen fuera de esa diagonal son genes con mayor expresión en una u otra muestra.

Con los dispositivos actuales podemos considerar que la expresión génica de los 30.000-50.000 genes de los organismos superiores puede analizarse de forma completa (empleando uno o dos *chips*). Esta afirmación deja de ser cierta si se consideran las distintas especies de RNA que se generan por procesamiento alternativo, que en la mayoría de los casos conducen a la síntesis de proteínas distintas y por tanto a distintos fenotipos. Varias estimaciones apuntan a que el número de genes debe multiplicarse por un factor de 3-5 para contabilizar estas variantes (4). Sin embargo, cuando hablamos de variantes alélicas aún no se ha alcanzado la escala genómica. De la secuenciación del genoma de los primeros individuos (2) se concluye que al menos existen 3 millones de posiciones susceptibles (SNP) de variación, y si bien es cierto que la mayoría de ellas no deben trascender fenotípicamente, tal vez entre un cinco y un diez por ciento sí podrían alterar cualitativa o cuantitativamente la expresión génica. Los *chips* disponibles están al menos un orden de magnitud por debajo de lo necesario, algo que sin embargo sólo será cuestión de pasos adicionales de miniaturización. El futuro del análisis del genoma en la especie humana ineludiblemente pasará por la obtención de la secuencia completa de cada uno de los individuos. Esta aproximación es extremadamente ambiciosa ya que, empleada como un análisis rutinario y con las técnicas actuales, es algo que hoy en día sobrepasa las capacidades físicas, económicas y temporales de los laboratorios al efecto. Por tanto, nuevas estrategias deben ser desarrolladas, y entre ellas, la identificación y caracterización de moléculas únicas de ácido nucleico parecen las más prometedoras (ver <http://www.solexa.co.uk> y <http://www.usgenomics.com>).

2. La genómica en investigación y diagnóstico clínicos

Uno de los objetivos de la investigación clínica es la identificación de parámetros que predigan el desarrollo de una enfermedad. En este sentido, y desde el punto de vista genético, al menos son dos las preguntas para las que deseáramos tener respuesta. En primer lugar, ¿existe alguna predisposición genética en los individuos para desarrollar alguna enfermedad? En segundo lugar, ¿es posible estudiar el perfil de expresión génica de un tejido patológico en alguna de sus etapas de desarrollo para clasificarlo en términos de pronóstico y tratamiento futuros? Uno de los ejemplos paradigmáticos de enfermedad abordable desde estos dos puntos de vista es el cáncer. Así, la experiencia acumulada en el estudio del cáncer familiar ha puesto al descubierto varios genes clave (retinoblastoma, p53, BRCA, APC, etc.) de los que determinados alelos están fuertemente ligados al desarrollo de tumores (5). Sin embargo, también cabe preguntarse si otros genes, otros alelos o sus diversas combinaciones, tienen cierta responsabilidad en el cáncer no familiar. Muy posiblemente, las respuestas satisfactorias sólo podrán venir desde aproximaciones que aborden el análisis genético a escala genómica y que permitan correlacionar conjuntos de SNP con predisposición a la enfermedad. Idealmente, el perfil alélico de cualquier individuo informará no sólo de esta predisposición, sino de la de otras muchas enfermedades de las que aún desconocemos su componente genético, con la ventaja de que esa información estaría disponible desde el nacimiento o incluso antes, en la mayoría de los casos en momentos previos a la aparición de los síntomas, con lo que será posible una medicina preventiva más efectiva.

El análisis fenotípico de los tumores sí que está ya siendo llevado a cabo mediante microarrays de DNA con intención pronóstica. Subyacente a esta cuestión está la asunción de que el desarrollo futuro de un tumor está en gran medida condicionado por el patrón de genes expresados en un momento dado, por ejemplo, en sus inicios. Un ejemplo claro que demuestra la validez de estos presupuestos es un estudio realizado sobre pacientes jóvenes de cáncer de mama sin nódulos afectados por la enfermedad (6). El problema con este grupo de pacientes es que los predictores actuales basados en características histológicas no consiguen asignar con fiabilidad el futuro de la enfermedad, con lo que un gran número de ellos recibe un tratamiento quimioterapéutico que no habría necesitado. Analizando la expresión de 25.000 genes en más de cien biopsias tumorales, 5.000 mostraron alguna variación entre las distintas muestras; finalmente, el patrón de expresión de 70 genes concretos permitió asignar con alta fiabilidad los distintos pacientes a dos grupos, uno con mal pronóstico, que desarrolló metástasis durante los siguientes cinco años, y otro con buen pronóstico, que permaneció libre de enfermedad durante más de cinco años. El estudio se amplió posteriormente a pacientes con nódulos ya afectados por la enfermedad (7) y de nuevo la expresión de esos 70 genes permitió una clasificación de los pacientes mucho más fiable que la basada en indicadores más tradicionales, como el consenso de los Institutos Nacionales de Salud de EEUU o el criterio St. Gallen.

Lógicamente, el uso de las técnicas genómicas no se limita al análisis del cáncer. Los microarrays de DNA también han permitido analizar los cambios de expresión génica asociados a otras enfermedades como la distrofia muscular (8), el Alzheimer (9), la esquizofrenia (10) y la infección por VIH-1 (11), entre otras patologías. Es de esperar que estos y otros estudios permitan identificar para cada enfermedad los genes que cualitativa y cuantitativamente son relevantes tanto para el diagnóstico como para su tratamiento. En base a tales conocimientos, los desarrollos futuros ofrecerán chips específicos de enfermedad, presumiblemente más baratos y de un manejo más sencillo que los dispositivos actuales, de tal manera que puedan universalizarse en los sistemas de salud tanto públicos como privados.



○ Bibliografía

1. Watson, J. D.; Crick, F. H. C.: Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 1953; 171:737-738.
2. Venter, J. C.; Adams, M. D.; Myers, E. W.; Li, P. W.; Mural, R. J.; Sutton, G. G.; *et al.*: The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291:1304-51.
3. Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M. C.; Baldwin, J.; *et al.*: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409:860-921.
4. Modrek, B.; Lee, C.: A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet.* 2002; 30:13-9.
5. Knudson, A. G.: Cancer genetics. *Am J Med Genet* 2002; 111:96-102.
6. Van't Veer, L. J.; Dai, H.; van de Vijver, M. J.; He, Y. D.; Hart, A. A.; Mao, M.; *et al.*: Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415:530-6.
7. Van de Vijver, M. J.; He, Y. D.; van't Veer, L. J.; Dai, H.; Hart, A. A.; Voskuil, DW.; *et al.*: A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347:1999-2009.
8. Chen, Y. W.; Zhao, P.; Borup, R.; Hoffman, E. P.: Expression profiling in the muscular dystrophies: identification of novel aspects of molecular pathophysiology. *J Cell Biol* 2000; 151:1321-36.
9. Ginsberg, S. D.; Hemby, S. E.; Lee, V. M.; Eberwine, J. H.; Trojanowski, J. Q.: Expression profile of transcripts in Alzheimer's disease tangle-bearing CA1 neurons. *Ann Neurol* 2000; 48:77-87.
10. Mirnics, K.; Middleton, F. A.; Márquez, A.; Lewis, D. A.; Levitt, P.: Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron* 2000; 28:53-67.
11. Geiss, G. K.; Bumgarner, R. E.; An, M. C.; Agy, M. B.; van't Wout, A. B.; Hammersmark, E.; *et al.*: Large-scale monitoring of host cell gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarrays. *Virology* 2000; 266:8-16.

Identificación y catalogación de proteínas:

○ Primeros objetivos de la era post-genómica

La Proteómica es una de las áreas tecnológicas de mayor relevancia científica de la era post-genómica. La enorme cantidad de información generada por los proyectos de secuenciación de genomas y la necesidad de descifrar esta información han desplazado el foco de atención hacia el estudio directo de las proteínas. La proteómica como análisis a gran escala de las proteínas se ha convertido en una de las más importantes disciplinas para la caracterización de la función de los genes, para la construcción de las interacciones entre las moléculas de proteínas, así como para arrojar luz sobre los mecanismos de procesos biológicos desde una aproximación de alta procesividad. La Proteómica se está convirtiendo, pues, en una estrategia experimental clave para la ciencia del siglo XXI, y constituye un campo emergente de la biotecnología cuyo desarrollo reviste una importancia estratégica de primer orden.

1. Bases de datos generadas por los proyectos de secuenciación de genomas

Los programas de secuenciación de genomas completos inciden directamente en aumentar la base sobre la que se soportan todas las estrategias de identificación a gran escala de proteínas. Son ya más de 166 los organismos cuyos genomas han sido secuenciados y anotados de los que 17 son de arqueas, 128 de bacterias y 21 pertenecen a organismos eucariotas incluido el *homo sapiens* (3.285 Mb, millones de nucleótidos, 99% anotado); además cerca de 700 genomas virales, 250 de plásmidos, 90 de fagos, y 200 de organelos están depositados en las bases de datos públicas. A todo esto hay que sumar los 415 genomas de organismos procariotas y 360 de eucariotas que están en proceso de secuenciación (GOLD, 14-Nov-2003) (1). Esta anotación de genes, junto con el análisis a gran escala de ARNm está arrojando luz a cerca de qué proteínas esperamos encontrar en un organismo, en qué nivel deben estar presentes y en qué momento ellas podrían ser expresadas. No obstante el genoma no define las modificaciones post-traduccionales de las proteínas, ni su actividad, ni su localización, ni las interacciones con otras proteínas y/o metabolitos.

La enorme información así generada, y en continuo crecimiento, supone el sustento sobre el que empieza a definirse el nuevo reto de la etapa post-genómica: la identificación y catalogación de los productos que expresan estos genes.

2. Definición de términos

La proteómica es la ciencia que correlaciona las proteínas con sus genes: las células expresan varios miles de proteínas diferentes y cada una de éstas puede experimentar numerosas modificaciones post-traduccionales dinámicas en respuesta a microambientes cambiantes, lo cual incrementa de forma significativa el número de especies proteicas diferentes presentes (2). Por tanto el proteoma es "*una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas por un organismo, célula o compartimiento subcelular concreto en un momento dado y bajo determinadas condiciones*", constituyendo el mapa de expresión proteica de un organismo, tejido o célula dado en condiciones concretas de tiempo y ambiente.

La ciencia de la proteómica no es nueva en sus bases experimentales, pero ha dado un salto cualitativo y cuantitativo sensible gracias al desarrollo convergente de diferentes áreas de investigación como son los proyectos de secuenciación de distintos genomas, la potencia computacional actual junto a herramientas bioinformáticas, además de un refinamiento sin precedentes en las técnicas de análisis de proteínas, tanto en sus posibilidades como en su sensibilidad.

Básicamente, la proteómica pone en juego un conjunto de técnicas destinadas a *resolver*, *cuantificar* e *identificar* y *caracterizar* proteínas así como *almacenar* y *analizar* los datos. Se ha aplicado a tres tipos de estudios y como tales suelen referirse las áreas principales en las que esta puede ser dividida:

- | | | |
|--|--|--|
| <p>A. La identificación y microcaracterización sistemática de proteínas, con el objetivo de abordar la identificación a gran escala de los componentes de un proteoma y de determinar sus modificaciones postraduccionales.</p> | <p>sufren alteraciones en sus niveles de expresión a consecuencia de cambios en su entorno, situaciones de estrés, administración de drogas, efectores o señales bioquímicas o su estado fisiopatológico.</p> | <p>caracterizando las interacciones que tienen lugar en el interior de la célula, y responde a la noción cada vez más extendida de que las proteínas no actúan en forma aislada sino que tienden a formar grandes complejos. Mediante este tipo de proyectos, aplicados de forma sistemática, se pretende la construcción de un mapa físico de las interacciones existentes entre las proteínas celulares.</p> |
| <p>B. La identificación de los componentes del proteoma que sufren alteraciones en sus niveles de expresión a consecuencia de alteraciones fisiopatológicas ("<i>Proteómica de Expresión Diferencial</i>"). Estos proyectos pretenden identificar qué proteínas</p> | <p>C. La caracterización de las interacciones subcelulares existentes entre las proteínas y la determinación de los componentes de complejos macromoleculares ("<i>Proteómica de Mapa Celular</i>"). Estos proyectos pretenden elucidar la función de las proteínas</p> | |

○ Metodología

La estrategia experimental troncal (Figura 1) es común para la mayoría de los proyectos proteómicos, básicamente supone:

1. Separación de proteínas por electroforesis bidimensional

El primer paso lo constituye la electroforesis bidimensional (2D-E), el centro neurálgico de la tecnología del proteoma, es el método de elección en los grandes proyectos de proteómica para separar simultáneamente hasta miles de componentes individuales en mezclas complejas de proteínas (Figura 1). La primera dimensión separa las proteínas en función de sus puntos isoeléctricos (electroenfoque), mientras que la segunda dimensión lo hace según su tamaño por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).

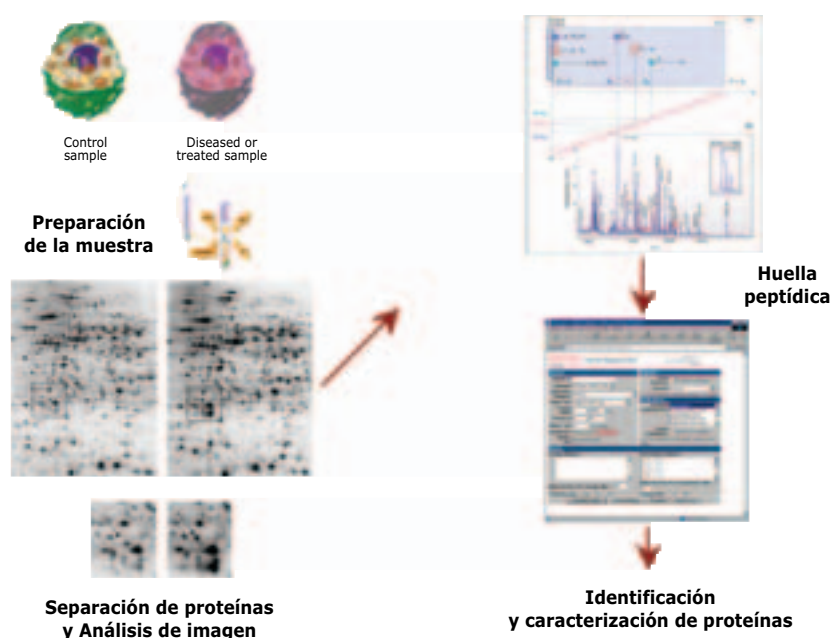


Figura 1. Estrategia analítica generalmente utilizada en análisis de proteómica.

2. Obtención del patrón de expresión proteico y análisis de imágenes

Después de desarrollar la segunda dimensión de la electroforesis se visualizará el patrón de expresión proteico utilizando un amplio abanico de métodos de tinción (plata, azul de Coomassie, tinción inversa, fluorescencia, radioactividad) que con distintos grados de sensibilidad (por debajo del ng por mancha) permitirá visualizar, escanear y analizar las imágenes del patrón de expresión de proteínas. El análisis de imágenes (patrón de expresión) se lleva a cabo mediante el uso de programas informáticos (ImageMaster, Mellanie u otros) que facilitarán la comparación entre las distintas condiciones y con bases de datos de geles de 2-D existentes en el dominio público de la red de Internet.

3. Identificación y Caracterización de Proteínas

La identificación de proteínas se lleva a cabo a partir del conocimiento de uno o varios atributos de las mismas que son ajustados frente a una o varias bases de datos.

4. Obtención de Huellas Peptídicas de Proteínas

La estrategia de elección más importante en el proceso de identificación y caracterización de las proteínas elegidas a partir de los geles de 2-D viene definida por la espectrometría de masas (EM) que es una tecnología analítica esencial en el contexto de la proteómica debido a su alta capacidad de análisis, su sensibilidad y su precisión en la determinación de las masas moleculares de péptidos y proteínas, así como por la información sobre la composición molecular que se deriva de la masa molecular. La primera y más importante opción para el análisis de mezclas complejas de digeridos proteicos es la espectrometría MALDI-TOF que utiliza una técnica de generación de iones por desorción/ionización mediante láser inducida por matriz (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, MALDI). La estrategia más utilizada para identificar una proteína dada es volcar, mediante softwares específicos (ProFound, Mascot, p.ej.), en una base de datos de proteínas las masas provenientes de los digeridos proteicos (huellas peptídicas) obtenidas por espectrometría de masas donde se ajustan estas con las que provienen de digerir teóricamente las distintas proteínas presentes en las distintas bases de datos (3). Si el genoma del organismo o especie está secuenciado y su información es accesible a las bases de datos públicas esta búsqueda-rastreo dará un resultado que será una proteína candidata con un grado de fiabilidad determinado.

5. Obtención de Espectros MS/MS

La comprobación de que la proteína candidata con mayor probabilidad sea inambiguamente la proteína aislada se realiza por fragmentación de alguno de los iones moleculares obtenidos en el espectro de huellas peptídicas y que corresponde a una secuencia dada de la proteína candidata.

En determinadas circunstancias hay que recurrir a la obtención de espectros de masas basados en otro tipo de fuente de ionización para generar los iones peptídicos: la ionización por electronebulización (Electrospray Ionisation, ESI). Esta técnica de ionización que genera una amplia colección de iones metaestables (4) y por tanto más fácilmente fragmentables, exige una pureza extrema en la preparación de la muestra requiriendo una purificación previa de esta por cromatografía capilar de alta resolución (nano-HPLC), la confinación de los iones generados en una trampa iónica o cuadrupolo y su posterior fragmentación en una cámara de colisión, permite la obtención de información secuencial.

6. Caracterización de las modificaciones co- y post-traduccionales

Las mutaciones puntuales y las modificaciones co- y post-traduccionales pueden quedar de manifiesto en un análisis de masas por la diferencia que se observa entre la masa esperada y la obtenida experimentalmente.



FindMod es un programa bioinformático, disponible desde la página ExPASy de Internet, diseñado para la identificación de modificaciones post-traduccionales de proteínas. Analiza las masas de la huella peptídica de proteínas conocidas para determinar la presencia de hasta 22 tipos de modificaciones post-traduccionales de masas discretas como, entre otras, acetilación, amidación, fosforilación, farnesilación, geranil-geranilación, carboxilación, glicosilación, miristoilación, palmitoilación. Si una diferencia de masa corresponde a una modificación conocida que aún no está anotada en la base de datos SWISS-PROT, el programa aplica un conjunto de reglas "inteligentes" a la secuencia del péptido de interés y realiza predicciones acerca del aminoácido que más probablemente porte la modificación.

○ Limitaciones

Obviamente, estas metodologías no están exentas de problemas, resultando difícil, en algunos casos, la interpretación de los resultados. Así, entre los principales problemas asociados a la 2D-E se encuentra la solubilización de las proteínas, tanto en lo referente al procedimiento inicial de extracción como al proceso de transferencia de proteínas desde las tiras de IPG a los geles de la segunda dimensión. Por otro lado, aunque el uso de gradientes de pH inmovilizados sobre soportes plásticos (inmobilinas) ha mejorado notablemente la reproducibilidad de la primera dimensión, esta característica no está garantizada, necesitándose un alto número de geles para la consecución de réplicas en número estadísticamente relevante a fin de obtener geles promediados de referencia. Otros problemas provienen de la sensibilidad de detección de proteínas y del poder de resolución de la técnica, principalmente en el rango básico de pH. Más importante, las limitaciones intrínsecas derivadas de esta técnica de separación: proteínas de peso molecular superior a 100 kDa, inferior a 10 kDa, de pI inferiores a 3.5 y superiores a 9, las expresadas a bajo nivel y sobre todo las hidrofóbicas, están propiciando la necesidad de incluir otras aproximaciones para complementar la ventana de análisis que ofrece la 2-D.

Respecto a la EM, la masa experimental de proteínas aisladas en geles puede ser diferente de la obtenida para proteínas puras como consecuencia de reacciones laterales como las que tienen lugar en Met o Trp (oxidación), Cys o grupos N-terminales libres (acrilamidación) o formación de iones aductos en presencia de altos niveles de sales, Coomassie o SDS.

En la huella peptídica, la interpretación del espectro de masas se complica porque no todos los fragmentos proteolíticos se extraen de igual manera, permaneciendo, tras la digestión, un número indeterminado de péptidos retenidos en los geles o membranas. Por otro lado, el modo de ionización intrínseco al bombardeo por láser, puede producir fragmentaciones no deseadas en la molécula polipeptídica (rotura de algunos enlaces lábiles) que hagan inviable el análisis fiable de determinados péptidos. De ser así, resulta recomendable el empleo de otros métodos de ionización basados en principios diferentes (p. ej., la electronebulización o ESI).

Por otra parte, no todos los posibles iones pueden observarse claramente y algunos están ausentes. Por último, cabe señalar que la accesibilidad a cualquier banco de datos, ya sea genómico o de proteínas, no es todavía universal.

○ Aproximación proteómica al diagnóstico clínico

La genómica ha aumentado sustancialmente el conocimiento que se poseía sobre muchas enfermedades, abriendo nuevas avenidas terapéuticas. La proteómica correlaciona las proteínas con sus genes siendo un área de investigación que conjuga factores genéticos y ambientales. Una enfermedad se puede producir por un intercambio de un solo par de bases en un genoma. Sin embargo, la mayor parte de las enfermedades son más complejas y la elucidación de sus mecanismos patológicos más complicada. Para comprender los mecanismos moleculares subyacentes al desarrollo de la enfermedad se precisan métodos adecuados a esta complejidad. La etiología de numerosas enfermedades es de carácter multifactorial y poligénica. Las proteínas, como productos de los genes y como macromoléculas efectoras, son los candidatos principales como moléculas diana en el desarrollo de enfermedades. La composición proteica "proteoma" representa el estatus funcional de un compartimiento biológico.

El término "proteómica clínica" hace referencia a la aplicación de la tecnología proteómica disponible al campo de la investigación clínica actual. La posibilidad de analizar de una forma exhaustiva y simultánea, cambios en un gran número de proteínas en el contexto de una enfermedad o de distintas condiciones fisiológicas sitúa a la proteómica como una prometedora herramienta para abrir soluciones a cuestiones difíciles de investigación clínica. De hecho, ya se han aplicado extensivamente análisis proteómicos para estudios clínicos que van desde el cáncer a enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas, al trasplante de órganos o estudios farmacodinámicos.

Los métodos proteómicos descritos con anterioridad generan patrones globales de expresión de proteínas de manera similar a como los microarrays de ADN pueden definir patrones exhaustivos de expresión de ARNm.

La electroforesis bidimensional, en combinación con diferentes formas de espectrometría de masas se ha utilizado para generar un mapa proteómico del cerebelo adulto del ratón (5), de la rata (6) y del cerdo (7). En el estudio desarrollado con cerebelo de rata se visualizaron más de 3.000 "spots" o manchas proteicas en geles bidimensionales identificándose 67 de estas y utilizadas como referencia para la comparación con los perfiles de cerebelos obtenidos a lo largo del desarrollo (a días 0, 3, 7, 14 y 21 postnatales). Aunque la mayor parte de las proteínas se incrementaban en abundancia con la maduración del cerebelo 42 "spots" se expresaban exclusivamente, o muy abundantemente, en el cerebelo inmaduro, 29 de las cuales fueron identificadas por huella peptídica, algunas con función desconocida y otras con claro papel en el desarrollo del sistema nervioso.

Por otro lado, se han construido mapas 2-D de proteínas de cerebros completos de ratón (8), rata (9) y humano (10) para facilitar el análisis sistemático del proteoma cerebral completo. Se han identificado más de 200 proteínas pudiéndose clasificar como proteínas estructurales, como enzimas implicadas en el metabolismo energético, en la síntesis de proteínas, en la degradación de proteínas, en la transcripción del RNA, proteínas de respuesta al estrés oxidativo, además de proteínas sinápticas. Dado que estos mapas han sido construidos a partir de cerebros totales, las proteínas derivan de neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células sanguíneas. El uso de cultivos de células purificados, citometría de flujo, "immunopanning", microdissección mediante captura por láser (LCM) y otras técnicas de selección, reducirán la complejidad de las mezclas de proteínas y facilitarán la identificación tanto de las asociadas específicamente a algún tipo celular como de las menos abundantes.

La construcción de mapas del proteoma cerebral está sirviendo como base de datos de referencia para estudiar los cambios en los niveles de proteínas asociados al desarrollo, envejecimiento, comportamientos anormales, o los distintos desordenes que afectan al sistema nervioso como las enfermedades de Alzheimer o Huntington.

Análisis proteómicos se han llevado a cabo con muestras de cerebros humanos con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (11) donde se identificaron 37 proteínas asociadas específicamente a esta enfermedad, o a cerebros de ratones transgénicos que modelan enfermedades neurodegenerativas humanas (enfermedad de Pick). La sobreexpresión de la proteína Tau (12) ha sido asociada a numerosas enfermedades neurodegenerativas: síndrome de Down, enfermedad de Pick y otras, además de Alzheimer. Asimismo se han generado ratones que sobreexpresan la serin-treonin kinasa GSK-3 β , que fosforila tau, y comparados los proteomas cerebrales de estos con los normales evidenciándose hasta 51 cambios (13).

Análisis proteómicos recientes han demostrado cambios en la familia semaforina/colapsina y proteínas relacionadas con la dihidropirimidina en muestras de cerebro fetal de pacientes con síndrome de Down (14). Asimismo, mediante aproximaciones proteómicas se ha podido evidenciar que ciertas formas de daño cerebral y enfermedades neurodegenerativas se asocian a alteraciones en la expresión de proteínas implicadas en la regulación del crecimiento y mantenimiento de la integridad de procesos neuronales (15). La localización, identificación y caracterización de las proteínas y del gen o los genes responsables puede ayudar a la comprensión de los mecanismos fisiológicos que se desencadenan en enfermedades neurodegenerativas.



La estrategia clásica proteómica de identificación masiva de proteínas se ha aplicado extensivamente para la detección de proteínas asociada a tumores: cáncer de colon, hepatocarcinomas (16), fibrosarcoma (17), cáncer de vejiga (18, 19), cáncer de mama (20, 21), cáncer de pulmón (22), cáncer de riñón (23), cáncer de ovario (24), próstata (25), médula ósea (26, 27).

Existen numerosos marcadores tumorales descritos (28), sin embargo, sólo unos pocos se han revelado útiles en el diagnóstico y en el pronóstico clínico de supervivencia y recurrencia. Por ello, continúa siendo de relevancia la descripción y caracterización de nuevos marcadores.

Más recientemente se ha comenzado su aplicación a distintos y variados problemas biológicos, como son: a) el estudio de determinantes de patogenicidad y resistencia a antibióticos en microorganismos (29, 30); b) desórdenes y degeneración del sistema nervioso (31, 32); c) patologías humanas organo-específicas (33), entre otras.

○ Perspectivas ("Proteómica de segunda generación")

La disponibilidad de tiras de IPG de rango de pH estrecho mejorará el poder de resolución de la 2D-E al expandir áreas específicas de pH. Será necesario avanzar en la capacidad de focalización de las tiras de IPG en la zona básica si se requiere el análisis total de un proteoma. El uso de distintos fluorocromos para visualizar diferencialmente (mediante lectores de fluorescencia adecuados) proteínas provenientes de muestras problema versus control en un mismo gel (DIGE) supone un claro avance en el análisis comparativo de la expresión diferencial de proteínas. Por otro lado, para el análisis a gran escala de proteomas es preciso desarrollar una plataforma integrada que cubra el análisis de imágenes y la escisión y digestión de las manchas de proteína de los geles de 2D-E.

Sin embargo, las limitaciones intrínsecas derivadas de la técnica de separación (proteínas de peso molecular superior a 100 kDa, inferior a 10 kDa, de pI inferiores a 3.5 y superiores a 9, las expresadas a bajo nivel y sobre todo las hidrofóbicas) están propiciando la necesidad de incluir otras aproximaciones para complementar la ventana de análisis que ofrece la 2-D. La utilización de técnicas de separación de péptidos basadas en la cromatografía líquida multidimensional (intercambio iónico, afinidad y fase reversa) en escala capilar o nana, en conjunción con espectrometría MS/MS (Q-TOF Nano-ESI) suponen herramientas irrenunciables para garantizar una identificación en la escala baja de los fmoles-attomoles de proteínas. Así, estrategias de análisis de expresión diferencial de proteínas como la **ICAT** (Isotope Coded Affinity Tag) (34) que combina marcaje químico diferenciado isotópicamente de lisados celulares, cromatografía capilar multidimensional de péptidos y espectrometría masas/masas se están empezando a utilizar por aquellos laboratorios con acceso a la instrumentación requerida [espectrómetro de masas Q-TOF, MALDI-TOF-TOF o nano-electrospray (nESI)]. Aplicaciones útiles de esta tecnología se han aportado en el caso de algunas enfermedades neurodegenerativas (35).

Alternativamente, el fraccionamiento de muestras complejas de proteínas mediante cromatografía de retención sobre chips y posterior análisis de estas por espectrometría de masas **SELDI** (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight) (36) supone una plataforma de análisis rápida, reproducible y robusta, extremadamente útil para el análisis comparativo de perfiles de expresión de proteínas en el rango bajo de los fmoles que, en conjunción con las otras espectrometrías de masas, facilita enormemente la identificación de proteínas.

Esta aproximación, proteinChip'-SELDI constituye la aplicación más efectiva de la utilización de chips de proteínas para el diagnóstico de tumores a partir de perfiles de proteínas en suero: hepatocarcinoma (37), cáncer de próstata (38, 39, 40, 41), cáncer de mama (42, 43) o cáncer de ovario (44, 45, 46), añadiéndose diferentes biomarcadores en el rango de 5 a 20 kDa, o en líneas celulares en cáncer colorectal (47).

La proteómica contiene el potencial para revolucionar tanto el diagnóstico clínico como el manejo de la enfermedad. La obtención de perfiles de expresión proteica en el suero mediante espectrometría de masas SELDI-TOF está emergiendo como un nuevo enfoque para la obtención de patrones de expresión de proteínas capaces de distinguir estados enfermos y libres de enfermedad con alto grado de sensibilidad y especificidad. Este

método se ha mostrado muy prometedor para el diagnóstico precoz de cáncer de ovario y está siendo aplicado en un amplio abanico de estadios patológicos.

La tecnología de los microarrays de proteínas está siendo evaluada como una nueva forma de monitorizar la respuesta biológica a la terapia. Mediante la medida de la fosforilación de proteínas en sitios clave bien sea en diferentes estados de la progresión de la enfermedad, bien sea antes y después de un tratamiento.

En la actualidad esta tecnología es rutinariamente utilizada en los Institutos Nacionales de Salud norteamericanos (NIH) en estudios clínicos de fase II de cánceres de ovario y mama (48). Las proteínas asociadas con las rutas de supervivencia y apoptosis celular son monitorizadas como marcadores biológicos de la progresión de la enfermedad en estos ensayos clínicos.

Tecnologías proteómicas como la obtención de patrones de proteínas séricas junto a las tecnologías de microarrays de proteínas constituyen el nuevo paradigma para la detección de enfermedades y monitorización de estas en respuesta a la terapia. Genómica y proteómica serán integrados en el tratamiento de los pacientes de cáncer a través de un diseño y un seguimiento de terapias individualizadas (49, 50).

○ Importancia y aplicabilidad

En resumen, las distintas técnicas de la proteómica pretenden obtener información acerca de las proteínas celulares que puedan resultar afectadas como consecuencia de un estadio fisiopatológico alterado. El análisis comparado de los patrones de expresión proteica de p.ej. tejidos tumorales es la base tanto para hallar potenciales marcadores asociados al desarrollo tumoral como de señalar futuras dianas terapéuticas útiles para la prevención del crecimiento de las células tumorales. Su estudio debe de conducir al establecimiento de métodos moleculares para clasificar el tipo tumoral y su invasividad lo que, a su vez, puede tener importantes consecuencias para el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

La identificación y caracterización de modificaciones postraduccionales en proteínas es un campo que se escapa a la información genética propiamente dicha por lo que la evaluación de la aproximación proteómica a este área tiene una gran relevancia.

Hoy en día, la proteómica constituye una de las áreas de investigación más pujantes. A pesar de todo su potencial, los estudios han de ser cuidadosamente seleccionados a fin de diferenciar niveles de expresión de proteínas como diferencias clínicas auténticas de aquellas derivadas de la recolección-manipulación de la muestra, variaciones derivadas de las condiciones experimentales y aquellas propias de una variabilidad biológica normal (51).

En conclusión, la electroforesis bidimensional, la cromatografía multidimensional, el análisis de imágenes, las espectrometrías de masas SELDI-TOF, MALDI-TOF, MALDI-TOF-TOF, Q-TOF y ESI-Trampa iónica (en tandem con nano-HPLC), constituyen poderosas técnicas bioanalíticas que junto a las Bases de Datos generadas por los proyectos de secuenciación de genomas y las herramientas bioinformáticas son útiles para la separación, identificación, caracterización y catalogación de proteínas en el contexto de los objetivos de la proteómica.



○ Bibliografía

1. Kyrpides, N.: Genomes Online Database (GOLD): *A monitor of complete and ongoing genome projects world wide*. Bioinformatics (1999); 15:773-774.
2. Wilkins, M. R.; et al.: *High-throughput mass spectrometric discovery of protein post-translational modifications*. J Mol Biol (1999) 289, 645-57.
3. Mann, M.; Hojrup, P. and Roepstorff, P.: Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. Biol Mass Spectrom (1993) 22, 338-45.
4. Gaskell, S. J.: *Electrospray: Principles and practice*. J Mass Spectr (1997) 32, 677-688.
5. Beranova-Giorgianni, S.; et al.: *Preliminary analysis of the mouse cerebellum proteome*. Brain Res. Mol. Brain Res. (2002) 98, 135-140.
6. Taoka, M.; et al.: *Protein profiling of rat cerebella during development*. Electrophoresis (2000) 21, 1872-1879.
7. Friso, G., and Wikstrom, L.: *Analysis of proteins from membrane-enriched cerebellar preparations by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry*. Electrophoresis (1999) 20, 91 -927.
8. Gauss, C.; et al.: *Analysis of the mouse proteome. (I) Brain proteins: separation by two-dimensional electrophoresis and identification by mass spectrometry and genetic variation*. Electrophoresis (1999) 20, 575-600.
9. Fountoulakis, M.; et al.: *Rat brain proteins: two-dimensional protein database and variations in the expression level*. Electrophoresis (1999) 20, 3572-3579.
10. Langen, H.; et al.: *Two-dimensional map of human brain proteins*. Electrophoresis (1999) 20, 907-916.
11. Schonberger, S. J.; et al.: *Proteomic analysis of the brain in Alzheimer's disease: molecular phenotype of a complex disease process*. Proteomics (2001) 1, 1519 -152
12. Tilleman, K.; et al.: *Proteomics analysis of the neurodegeneration in the brain of tau transgenic mice*. Proteomics (2002) 2, 656-665.
13. Pickering-Brown, S.; et al.: *Pick's disease is associated with mutations in the tau gene*. Ann. Neurol. (2000) 48, 859-867.
14. Weitzdoerfer, R.; et al.: *Aberrant expression of dihydropyrimidinase related proteins-2, -3 and -4 in fetal Down syndrome brain*. J. Neural Transm. Suppl (2001) 61, 95 -10
15. Morrison, R. S.; et al.: *Proteomic analysis in the neurosciences*. Mol Cell Proteomics (2002) 1: 553-6016).
16. Jungblut, P. R.; et al.: *Proteomics in human disease: Cancer, heart and infectious diseases*. Electrophoresis (1999); 20: 2100-2110.
17. Sinha, P.; et al.: *Search for novel proteins involved in the development of chemoresistance in colorectal cancer and fibrosarcoma cells in vitro using two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing*. Electrophoresis (1999) 20, 2961-2969.
18. Celis, J. E.; et al.: *Loss of adipocyte-type fatty acid binding protein and other protein biomarkers is associated with progression of human bladder transitional cell carcinomas*. Cancer Res (1996) 56, 4782-4790.
19. Celis, J. E.; et al.: *A comprehensive protein resource for the study of bladder cancer: <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>*. Electrophoresis (1999) 20, 300-309.
20. Giometti, C. S.; et al.: *A two-dimensional electrophoresis data base of human breast epithelial cell proteins*. Electrophoresis (1997) 18, 573-581.
21. Perou, C. M.; et al.: *Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial and breast cancers*. PNAS (1999) 96, 9212-9217.
22. Okuzawa, K.; et al.: *Characterization of gene expression in clinical lung cancer materials by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*. Electrophoresis (1994); 15:382-390.
23. Sarto, C.; et al.: *Renal cell carcinoma and normal kidney protein expression*. Electrophoresis (1997) 18, 599-604.
24. Lawson, S. R.; et al.: *Quantitative protein changes in metastatic versus primary epithelial ovarian carcinoma*. Gynecol Oncol (1991); 41:22-27.
25. Nelson, P. S.; et al.: *Comprehensive analyses of prostate gene expression: Convergence of expressed sequence tag databases, transcript profiling and proteomics*. Electrophoresis (2000) 21, 1823-1831.

26. Hannash, S. M.; et al.: *Two-dimensional gel electrophoresis of cell proteins in childhood leukemia, with silver staining: a preliminary report*. Clin Chem (1982) 28, 1026-1030.
27. Hannash, S. M.; et al.: *Data base analysis of protein expression patterns during T-cell ontogeny and activation*. Proc Natl Acad Sci USA (1993) 90, 3314-3318.
28. Carney, W.: *Human tumor antigens and specific tumor therapy*. Immunol Today (1988) 9, 363-364
29. Niimi, M.; et al.: *Candida albicans pathogenicity: a proteomic perspective*. Electrophoresis (1999) 11, 2299-308.
30. Cash, P.; et al.: *A proteomic analysis of erythromycin resistance in Streptococcus pneumoniae*. Electrophoresis (1999) 11, 2259-68
31. Johnston-Wilson, N. L.; et al.: *Emerging technologies for large-scale screening of human tissues and fluids in the study of severe psychiatric disease*. Int J Neuropsychopharmacol. (2001) 1, 83-92.
32. Rohlff, C.: *Proteomics in molecular medicine: applications in central nervous systems disorders*. Electrophoresis (2000) 6, 1227-34.
33. Cutler, P.; et al.: *An integrated proteomic approach to studying glomerular nephrotoxicity*. Electrophoresis (1999) 18, 3647-58
34. Gygi, S. P.; Rist, B.; Aebersold, R.: *Measuring gene expression by quantitative proteome analysis*. Current Opinion in Biotechnology (2000) 11, 396-401.
35. Yu, L.; et al.: *Proteome analysis of camptothecin-treated cortical neurons using isotope-coded affinity tags*. Electrophoresis (2002) 23, 1591 -1598.
36. Merchant, M. and Weinberger, R. S.: *Recent advancements in surface-enhanced laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry*. Electrophoresis (2000) 21:1164-77.
37. Poon, T. C.; et al.: *Comprehensive proteomic profiling identifies serum proteomic signatures for detection of hepatocellular carcinoma and its subtypes*. Clin Chem. (2003) 49: 752-60.
38. Petricoin, E. F.; et al.: *Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer*. J Natl Cancer Inst. (2002) 94: 1576-8
39. Adam, B. L.; et al.: *Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men*. Cancer Research, (2002) , 62 : 3609-14
40. Zheng, Y.; et al.: *Prostate carcinoma tissue proteomics for biomarker discovery*. Cancer. (2003).8 (12): 2576-82.
41. Miller, J. C.; et al.: *Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potential biomarkers*. Proteomics. (2003), 3 (1):56-63.
42. Li, J.; et al.: *Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer*. Clin Chem. (2002) 48, 1296-304
43. Vlahou, A.; et al.: *A novel approach toward development of a rapid blood test for breast cancer*. Clin Breast Cancer. (2003) 4, (3): 203-9.
44. Petricoin, E. F.; et al.: *Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer*. Lancet. (2002) 359(9306): 572-7.
45. Rai, A. J.; et al.: *Proteomic Approaches to tumor marker discovery*. Arch. Pathol. Lab. Med. 2002.126: 1518-26.
46. Mehta, A.; et al.: *Biomarker amplification by serum carrier protein binding*. Dis Markers. (2003-2004);19(1):1-10.
47. Shiwa, M.; et al.: *Rapid discovery and identification of a tissue-specific tumor biomarker from 39 human cancer cell lines using the SELDI ProteinChip platform*. Biochem.and Biophysical Research Communications, 2003. 309: 18-25.
48. Liotta, L. A.; et al.: *Protein microarrays: meeting analytical challenges for clinical applications*. Cancer Cell. (2003), 3 (4):317-25.
49. Espina, V.; et al.: *Protein microarrays: molecular profiling technologies for clinical specimens*. Proteomics. (2003), 3 : 2090-2100.
50. Espina, V.; et al.: *Use of proteomic analysis to monitor responses to biological therapies*. Expert Opin Biol Ther. (2004) 4(1): 83-93.
51. Baggerly, K. A.; et al.: *Reproducibility of SELDI-TOF protein patterns in serum: comparing data sets from different experiments*. Bioinformatics. (2004), 29: 1-9.



Bioinformática:

○ Primeros objetivos de la era post-genómica

Podemos comenzar por definir Bioinformática como la "Organización, manipulación y análisis de resultados en Biología Molecular y Biomedicina utilizando métodos computacionales". La historia de la Bioinformática es tan antigua como la propia Bioquímica y Biología Molecular, puesto que su desarrollo se ha realizado al hilo las necesidades de análisis generadas por la rápida evolución de las técnicas experimentales, particularmente en el caso de la Genética Molecular donde la información sobre la secuencia de genes y proteínas ha requerido desde el principio la organización, almacenamiento y análisis de la información generada experimentalmente. Un paralelismo igualmente estrecho se puede establecer con el desarrollo de nuevos algoritmos en Ciencias de la Computación, de los que la Bioinformática se nutre continuamente buscando aplicaciones específicas a los problemas de Biólogos y Biomédicos.

Esta situación hace que la Bioinformática pueda considerarse como una disciplina más de la Biología, en la que los instrumentos son distintos, en este caso computacionales, pero los problemas y finalidades son las mismas (1). En este contexto es un error pensar que la Bioinformática es sólo una mezcla de Biología e Informática, ignorando la metodología y aproximaciones propias que ha desarrollado durante todos estos años.

1. La Bioinformática como parte de la revolución Genómica

Aunque podamos trazar origen de la Bioinformática hasta hace 30 años, es evidente que su importancia y el papel central que ahora juega en la investigación en Biología y Biomedicina está directamente relacionado con la explosión de las técnicas de Genómica y Proteómica. La rápida evolución de estas áreas desde la secuenciación del primer genoma de un organismo completo, la bacteria *Helicobacter pylori* en 1995, hasta la publicación del primer borrador del genoma humano, han hecho evidente la necesidad de métodos computacionales capaces de lidiar con la nueva y compleja información.

Francis Collins (2), director del centro del National Human Genome Research Institute (NIH) y figura principal del esfuerzo de secuenciación del genoma humano, en un reciente artículo colocaba la Bioinformática como uno de los pilares fundamentales para el futuro desarrollo de la Genómica. En su concepción, la secuenciación del genoma humano sirve como base a una etapa en la que esa información genómica transformará efectivamente las prácticas en Biología, un proceso en el que estamos inmersos y del que los desarrollos de las técnicas de Genómica Funcional y Proteómica descritas en este capítulo son buena prueba. Esta etapa vendrá seguida de otra en la que la información genómica influirá directamente en el desarrollo de la Medicina (Biomedicina) una excitante posibilidad de la que vemos los primeros pasos en aplicaciones como el diagnóstico molecular del cáncer basado en datos de expresión génica. Finalmente, Collins describe una última etapa en la información genómica que acabará influyendo en la propia sociedad. Esta construcción basada en los desarrollos relacionados con la genómica y en particular la secuenciación del genoma humano está basada en varios pilares, que incluyen las relaciones con la sociedad (información y formación), los problemas éticos y legales tan importantes al tratar con información directa sobre la herencia genética, los desarrollos tecnológicos en los que se basan todas las nuevas técnicas robotizadas en Genómica, la formación de nuevos profesionales en este área (un problema absolutamente crítico y todavía no resuelto en nuestro país) y finalmente la Bioinformática. Es en este sentido en el que en este capítulo describimos las potencialidades que ofrece la Bioinformática en su aplicación práctica en Biomedicina en el contexto de la Genómica y Proteómica.

2. Bioinformática y manejo de la información genómica

En una primera aproximación el problema con que se enfrenta la Bioinformática, se relaciona con el análisis de la secuencia de ácidos nucleicos que componen los genomas. En este sentido contamos en la actualidad con 31 millones de entradas en la base de datos y 45.000 millones de bases, un millón de entradas de proteínas con 310 millones de

aminoácidos. La propia cantidad de datos generada crea problemas computacionales, de los que la secuenciación comercial del genoma humano puede ser un ejemplo. Para este proyecto fue necesario poner en marcha una colaboración entre una empresa de genómica y secuenciación (Celera), un fabricante de sistemas de secuenciación (Applied Biosystems) como parte de la corporación Applera, que a su vez colaboró con una compañía proveedora de ordenadores (Compaq, que en aquel momento construyó el mayor conjunto privado de ordenadores y es ahora parte de Hewlett-Packard) y compró otra compañía que desarrolla ordenadores de propósito específico (Paracel).

Con ser esta avalancha de datos un factor determinante de la evolución de la Bioinformática es importante no olvidar la importancia de la propia diversidad de los datos. La Biología Molecular y la Biomedicina generan no sólo muchos datos sino datos muy diversos lo que plantea problemas muy difíciles durante la generación de las correspondientes estructuras de bases de datos, métodos de almacenamiento, que deben adaptarse constantemente a los nuevos métodos.

➤ **Figura 1.** Principales bases de datos en biología molecular y biomedicina

Los dos centros que mantienen las bases de datos esenciales son en USA el NCBI y en Europa el EBI-EMBL, aunque otros muchos producen bases de datos focalizadas en diversos temas. Las principales bases de datos con contenido información sobre secuencias de genes y proteínas son una capa básica de información, sobre la que se han construido otras 500 bases de datos con información relacionada. Estas incluyen bases de datos combinando aspectos de motivos de secuencias, bases de datos relacionadas con variaciones génicas, estructura de proteínas, datos de genómica funcional y proteómica. Una mención especial merece la base de datos OMIM, especializada en datos moleculares relacionadas con enfermedades en humanos.

- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI) PARTE DE LA NATIONAL LIBRARY FOR MEDICINE DEL NIH [HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
- EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE (OUTSTATION DEL EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY) EBI-EMBL [HTTP://WWW.EBI.AC.UK/](http://www.ebi.ac.uk/)
- SANGER CENTER [HTTP://WWW.SANGER.AC.UK](http://www.sanger.ac.uk)
- GRUPO DE DISEÑO DE PROTEÍNAS, PDG (CNB-CSIC) [HTTP://WWW.PDG.CNB.UAM.ES](http://www.pdg.cnb.uam.es)
- BASES DE DATOS.
- SECUENCIAS DE DNA: [HTTP://WWW.EBI.AC.UK/EMBL/](http://www.ebi.ac.uk/embl/)
- SECUENCIAS DE PROTEÍNAS: SWISSPROT [HTTP://US.EXPAS.Y.ORG/SPROT/](http://us.expasy.org/spot/) Y TREMBL [HTTP://WWW.EBI.AC.UK/EMBL/](http://www.ebi.ac.uk/embl/)
- DOMINIOS DE PROTEÍNAS [HTTP://WWW.EBI.AC.UK/INTERPRO/INDEX.HTML](http://www.ebi.ac.uk/interpro/index.html)
- ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES: [HTTP://WWW.EBI.AC.UK/MSD/](http://www.ebi.ac.uk/msd/)
- BASES MOLECULARES DE ENFERMEDADES "ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN OMIM" [HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/OMIM/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/)
- MEDLINE, REPOSITORIO DE PUBLICACIONES CIENTÍFICAS EN BIOMEDICINA [HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/ENTREZ/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/)
- UN SISTEMA PARA NAVEGAR ENTRE BASES DE DATOS: [HTTP://SRS.EBI.AC.UK/](http://srs.ebi.ac.uk/)

3. Análisis del genoma humano y comparación con genomas modelo

El proyecto del genoma humano ha supuesto un punto focal de amplias repercusiones mediáticas. Desde el punto de vista técnico es uno de los genomas eucariotas secuenciados junto a levaduras, *Drosophila*, *C. elegans*, ratón, rata, *Arabidopsis*, arroz, fugu y otros. Además se han secuenciado más de 100 genomas bacterianos con un número de genes equivalente al tamaño del genoma humano. El esfuerzo de secuenciación, ahora llevado a cabo por centros altamente organizados y robotizados, continúa y esperamos disponer de decenas de genomas de organismos superiores en los próximos años.

El primer problema bioinformático de la secuenciación del genoma humano se refiere a la reconstrucción de la propia secuencia del ADN partiendo de los fragmentos secuenciados, seguido del análisis para detectar los genes y las señales de regulación génica. Este es un problema difícil puesto que las regiones que codifican para genes son muy pocas (menos del 5% del total del genoma) y las señales en la secuencia que separan las regiones codificadoras son muy tenues. En el mejor de los casos los programas de predicción de genes son capaces de predecir correctamente menos del 50% de los genes. Esta aproximación se suplementa con búsquedas de proteínas (vía sus RNA mensajeros) que sirven para verificar las predicciones, lo que permite mejorar las predicciones. Finalmente la comparación directa con otros genomas próximos (i.e. el genoma de ratón) puede utilizarse para confirmar la presencia de regiones codificantes conservadas.

Estamos por tanto en una situación en la que combinando información de genes, proteínas y genomas esperamos mejorar la definición de los genes humanos, cuyo número es todavía desconocido, puede oscilar entre 25.000 y 30.000.

➤ **Figura 2.** Resultados actuales del análisis del genoma humano

El ejemplo del cromosoma 22 de humanos está tomado del proyecto de anotación del Sanger Center (<http://www.ensembl.org/>).

En la figura se observa la localización de las bandas en las 49, 376, 972 pares de bases secuenciados, la densidad de la distribución de los 485 genes detectados en el cromosoma (más 91 en tono más claro detectados durante la re-anotación del cromosoma), la presencia de las secuencias repetidas características del genoma humano y la densidad de variaciones de un solo nucleótido (SNPs) correspondientes a las 120.765 localizadas para este cromosoma.

4. Predicción de la estructura y la función de las proteínas

La secuenciación y el subsiguiente análisis del genoma en términos de la detección de genes es necesaria para la obtención de información biológica relevante. El siguiente proceso consiste en comparar las secuencias de cada una de las proteínas (deducida de los genes detectados en el genoma) con la información disponible en las bases de datos para asignar una posible estructura y función a las correspondientes proteínas.

Las proteínas desarrollan su actividad biológica gracias a su capacidad para mantener una estructura tridimensional única, precisa, de la que depende completamente su función. Es por esto por lo que las compañías farmacéuticas realizan considerables esfuerzos para disponer de la estructura de las proteínas con las que trabajan, puesto que de ese modo pueden acelerar considerablemente el proceso de modificación y mejora de los correspondientes fármacos.

Obtener la estructura de las proteínas experimentalmente con métodos de RMN y rayos X es laborioso y caro. Por dar un ejemplo un consorcio de agencias y compañías Británicas y Canadienses han financiado con aproximadamente 100M\$ un proyecto para resolver 300 proteínas de interés farmacológico.

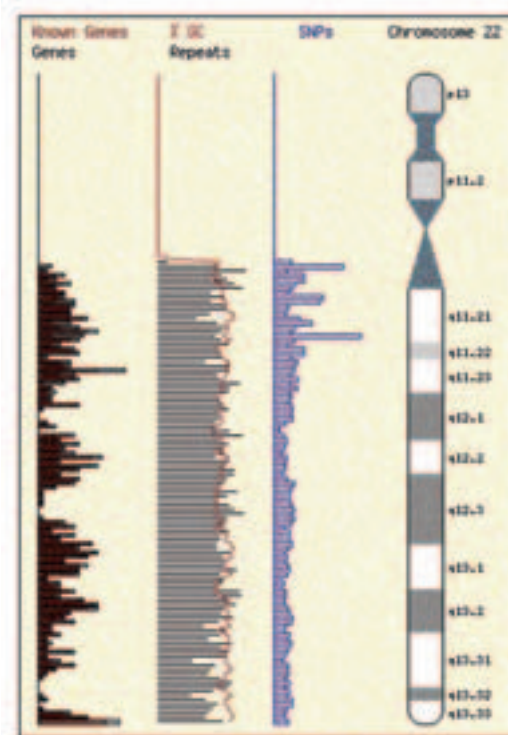


Figura 2. Resultados actuales del análisis del genoma humano.

Este esfuerzo experimental no puede en ninguno de los casos obtener una estructura para cada una de las proteínas conocidas y nuestro conocimiento de los procesos físicos subyacentes no es suficiente para reproducir el proceso de plegamiento de las proteínas computacionalmente (este es conocido como el problema del plegamiento de proteínas y permanece como uno de los mayores desafíos de la biología en el siglo XXI). Somos por tanto afortunados de disponer de las técnicas bioinformáticas de modelado por homología capaces de producir modelos útiles para las proteínas cuya secuencia es suficientemente parecida a proteínas de estructura conocida (basándose en una regla empírica que relaciona el parecido en secuencia con el parecido en estructura). De este modo es posible obtener estructuras (modelos) para aproximadamente el 25% de las proteínas de los genomas.

Nuevos métodos computacionales comienzan a hacer posible detectar parecidos más remotos y generar modelos para un mayor número de proteínas. Esperamos que la mejora de estas técnicas haga que en los próximos años sea posible predecir la estructura tridimensional para la mayor parte de las proteínas de interés directo, como por ejemplo dianas de medicamentos. Aún así es difícil pensar que la calidad de esos modelos vaya a ser en todos los casos suficientes para diseñar directamente fármacos utilizando métodos computacionales.

5. La bioinformática en genómica y proteómica: nuevos desafíos

Los desarrollos recientes han hecho que las posibilidades de la bioinformática se expandan enormemente más allá de los análisis de los genomas y proteínas arriba discutidos.

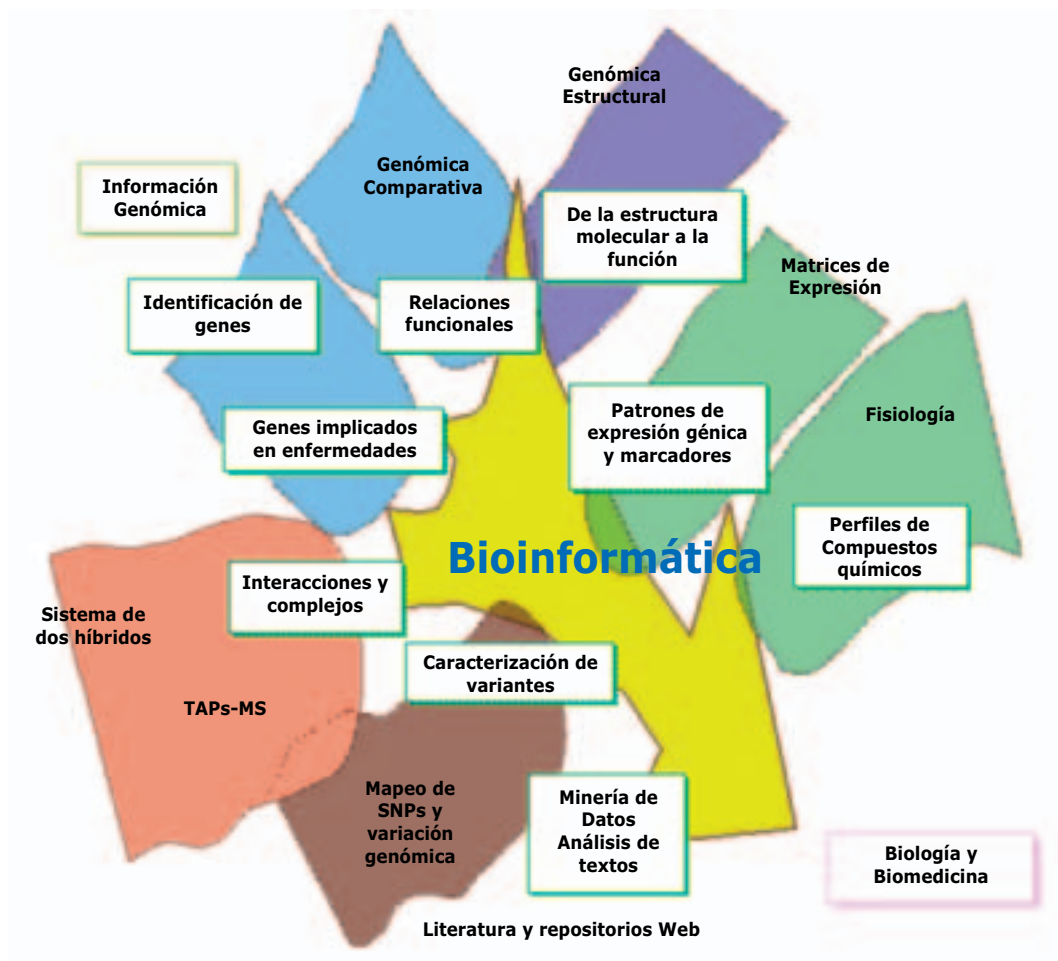


Figura 3. Confluencia de técnicas en la era post-genómica y papel central de la Bioinformática.

6. Niveles de expresión génica, y contenido proteico, en células y tejidos

El desarrollo de una tecnología de "expression arrays" y Proteómica (ver la sección específica en este capítulo) conllevan una serie de nuevos métodos computacionales para la organización y almacenamiento de la compleja información experimental generada, incluyendo el diseño de las bases de datos adaptadas a la cambiante tecnología, la capacidad para almacenar tanto imágenes como datos elaborados, la estimación de la significación estadística de los resultados, la comparación de los patrones de expresión o modificación en colecciones de genes y proteínas. Finalmente es extremadamente laboriosa la última etapa del análisis de los resultados, incluyendo la comparación de estos con la información sobre funciones y enfermedades disponible.

Varios sistemas públicos y privados contienen métodos para el análisis de los resultados de DNA arrays y experimentos de proteómica, incluyendo la creación de estándares para la comparación de resultados generados por distintos laboratorios. La novedad y rápida evolución de esta tecnología hacen imposible una única solución bioinformática y el proceso de análisis debe verse como parte del propio proceso experimental.

7. Variabilidad génica en y entre individuos

Una de las posibilidades más interesantes abiertas por las nuevas tecnologías genómicas es la exploración de las bases moleculares de la diferencia entre individuos. Los resultados de secuenciación (u otro tipo de métodos) a la detección de pequeños cambios entre individuos (SNPs) permiten observar que pueden asociarse con características físicas.

Esta información hace posible utilizar la observación de una serie de marcadores genéticos (SNPs) para predecir con una determinante fiabilidad estadística, la propensión a una enfermedad o la conveniencia de un tratamiento. El enorme potencial de estas aplicaciones corre en paralelo con la enorme complejidad del análisis sistemático de la relación estadística entre enfermedades y polimorfismos.

Varios proyectos han desarrollado este tipo de aproximaciones, incluyendo el esfuerzo público realizado en Estonia para relacionar mapeo de SNPs en grandes sectores de la población con los resultados de encuestas sobre enfermedades realizados por médicos de cabecera. Un esfuerzo similar es el que realiza la compañía DECODE en Islandia o por el consorcio público de HapMap.

Este tipo de aproximación es también la base de la llamada "medicina a la carta" en la que las compañías farmacéuticas pretenden desarrollar fármacos específicos para sectores de la población con determinadas características genómicas. En este caso se trataría de abaratar el coste de los ensayos clínicos delimitando de antemano las características de las poblaciones objetivo. Si bien es cierto que las posibilidades técnicas son reales, es difícil decir en qué punto los cálculos económicos y la regulación legal harán posible su implementación práctica.

8. Extracción de información a partir de la literatura

Los grandes repositorios de información textual disponibles, comenzando por los más de doce millones de publicaciones en Biología y Biomedicina (sus resúmenes están disponibles en un repositorio público llamado Medline), han promovido el desarrollo de sistemas bioinformáticos para su utilización sistemática, por ejemplo para establecer las relaciones entre las enfermedades, los genes asociados y sus funciones potenciales, todo ello deducido automáticamente de las correspondientes publicaciones. Este tipo de metodología está llamada a convertirse en una de las principales ramas de actividad en Bioinformática a medida que las distintas publicaciones comienzan a distribuirse en formatos electrónicos. Los problemas relacionados con la propiedad intelectual de las mismas publicaciones y el papel de las casas editoriales son ahora mismo objeto de una interesante discusión.

9. El futuro de las relaciones entre la Bioinformática y la Informática Médica

La información Genómica y Proteómica, junto al tratamiento bioinformático, están comenzando a introducirse en el proceso de diagnóstico de enfermedades, como por ejemplo con el uso de marcadores moleculares de procesos patológicos, como es por ejemplo la asociación de factores de riesgos mediante el estudio de la composición genómica y su variabilidad en individuos. En esta área se produce el encuentro directo entre la Bioinformática y la Informática Médica. La primera, como hemos visto más relacionada hasta ahora con la Biología Molecular y las técnicas genómicas y la segunda con la organización de bases de datos y repositorios sobre datos clínicos. Las posibilidades futuras de ese encuentro son enormes, puesto que de la adecuada intersección de las correspondientes bases de datos depende nuestra capacidad para detectar relaciones entre enfermedades y sus bases moleculares o entre tratamientos y respuestas. Las dificultades están hoy en día relacionadas con el acceso y el tipo de información almacenada en los expedientes clínicos, dificultades que de momento hacen que propuestas muy razonables sobre el papel no hayan llegado a implementarse en escenarios reales.



○ Bibliografía

1. Valencia, A. (2002): Bioinformatics: Biology by other means. *Bioinformatics*. 18:1551-1552.
2. Collins, F. S.; Green, E. D.; Guttmacher, A. E.; Guyer, M. S. (2003): A vision for the future of genomics research. *Nature*. 422:835-847.

Capítulo VII:



Tests genéticos: Implicaciones éticas y jurídicas

Autores:

Julian Ruíz Ferrán

- Médico Especialista en Farmacología Clínica. Diplomado especialista en Medicina Farmacéutica, Universidad Complutense de Madrid. Máster en Administración y Dirección de Servicios Sanitarios, ICADE. Máster en Economía de la Salud y Gestión Sanitaria, Universitat Pompeu i Fabra. Director Médico y miembro del Consejo de Administración de Sanitas.

Tests genéticos: implicaciones éticas y jurídicas

○ Introducción

Los avances experimentados en el transcurso de los últimos años en la comprensión de las bases genéticas de numerosas enfermedades gracias sobre todo a la biología molecular, han propiciado la aparición de un nuevo tipo de ámbito de actuación clínica: la Medicina Predictiva.

La Medicina Predictiva se basa en el principio de identificación de riesgos de población en general o en segmentos poblacionales en los cuales sus antecedentes familiares pudieran hacer sospechar la existencia de riesgos para padecer una enfermedad determinada.

En los países desarrollados las más importantes causas de muerte y dependencia son:

- a) las enfermedades cardiovasculares;
- b) el cáncer, y
- c) las enfermedades neurológicas incluyendo la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, etc. y las enfermedades psiquiátricas tales como la depresión, esquizofrenia, etc. que pueden abocar al absentismo laboral y a la discapacidad transitoria o permanente. La aparición de estas enfermedades en las etapas tempranas de la vida supone un gasto muy considerable tanto para los sistemas públicos de salud como para las compañías de seguros que tienen que asumir en muchos casos el gasto asistencial, las pensiones por discapacidad e indemnizaciones por accidente laboral o muerte.

Dado que cada año que pasa hay un mayor porcentaje de patologías cuya incidencia puede predecirse en la población debido a la identificación de factores específicos de riesgo o a factores de susceptibilidad genética, cada día es más posible mediante técnicas de genética molecular predecir el riesgo de grupos de población con bastantes años de antelación a la aparición de los primeros signos y síntomas de la enfermedad, con lo cual será posible:

- a) plantear estrategias de prevención;
- b) predecir los costes asociados al riesgo;
- c) definir actuarialmente primas de seguro en función del riesgo, y
- d) plantear nuevas políticas de prevención primaria y secundaria.

1. Concepto de test genético

Por pruebas genéticas se entienden aquellas herramientas de la Medicina que, mediante la exploración del código genético de una persona, son capaces de obtener resultados no sólo relativos al diagnóstico de una enfermedad, sino respecto de la propensión a padecerla en el futuro. Este tipo de diagnosis predictiva era muy difícil antes de desarrollarse las técnicas de investigación genética y, en cualquier caso, se trata de herramientas cuyo desarrollo está por ver en gran medida en lo tocante en su aplicación en Medicina.

Apenas tres años después de haberse publicado el mapa completo del genoma humano, nadie puede aseverar con qué rapidez, en qué medida y con qué fiabilidad van a ir haciendo su aparición las pruebas genéticas, si van a poder hacerse en condiciones de bajo coste, qué infraestructura será necesaria para ello, etc. Por lo tanto, existe un primer concepto fundamental: las pruebas genéticas son una realidad en una etapa de desarrollo relativamente incipiente, que probablemente durante muchos años, e incluso décadas, y por ello su regulación deberá ser por fuerza evolutiva.

De lo que no parece haber duda es que la utilización de tests genéticos para diagnosticar o predecir enfermedades constituirá en un futuro no muy lejano una herramienta médica para mejorar la salud de la población a nivel individual, a través del conocimiento de la susceptibilidad genética para padecer ciertas enfermedades.

2. Utilidad del diagnóstico genético

De acuerdo con el *Committee on Assessing Genetic Risks* del Instituto de Medicina del Gobierno de los Estados Unidos, la aplicación de las pruebas genéticas se circunscribe, en principio, a las siguientes áreas:

- DIAGNÓSTICO PRENATAL.
- DESPISTAJE DE RECIÉN NACIDOS.
- IDENTIFICACIÓN DE PORTADORES DE RIESGO GENÉTICO.
- TESTAJE DE ENFERMEDADES DE APARICIÓN TARDÍA.

En el último grupo se incluyen la mayoría de las enfermedades que hacen su aparición en la edad adulta o en períodos preseniles y seniles. En este grupo se encuentran, entre otras muchas, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer, la hipercolesterolemia familiar, la hemocromatosis, la diabetes, la hipertensión, la enfermedad poliquística renal, la artritis reumatoide y la susceptibilidad para padecer diversos tipos de cardiopatías y cáncer.

En algunas enfermedades, las pruebas genéticas pueden evidenciar si una persona tiene una probabilidad más alta de lo normal de desarrollar una enfermedad concreta a lo largo de su vida, mientras que en otras enfermedades los resultados de las pruebas son más aleatorios. En cualquier caso hay que tener en cuenta que en un alto porcentaje de casos los genes contribuyen a la aparición de una enfermedad concreta sin ser su causa única. La enfermedad se desarrollará únicamente si es desencadenada por un factor desconocido ligado a la dieta o al medio ambiente, o cuando concurren otros genes. Se estima que es sólo cuestión de tiempo que esas combinaciones se analicen rutinariamente.

Los análisis genéticos son pues un instrumento útil para realizar estudios sobre personas o grupos de población que presentan un riesgo de desarrollar una enfermedad condicionada genéticamente o una predisposición a una enfermedad años antes de que ésta se manifieste clínicamente. Sus resultados pueden predecir el grado de probabilidad del desarrollo futuro de la enfermedad, para la que puede existir una terapéutica específica o no, descartar por completo su aparición o confirmar la existencia de un riesgo superior a otras personas, o la de un riesgo semejante al del mismo grupo de población (1).

3. Test genéticos y seguros de vida y enfermedad

Las compañías aseguradoras son tomadores de riesgo profesionales. Calculan la probabilidad de que los diferentes tipos de riesgo se produzcan y las primas necesarias para crear un fondo financiero lo suficientemente grande para cubrir los pagos ligados a los siniestros incurridos.

Una operación de seguro es aquel contrato mediante el cual alguien (el asegurador) garantiza una cobertura económica ante determinado riesgo si es que finalmente se concreta en un acontecimiento de carácter negativo que supone para una persona (el asegurado, el tomador de la póliza o el beneficiario) una pérdida patrimonial o de salud. En consecuencia, la actividad de constituir operaciones de seguro consiste, desde el punto de vista del asegurador, en fijar cuánto vale el riesgo que está cubriendo, repercutiendo el riesgo financiero en la prima que paga el cliente.

Por ejemplo, cuando una persona solicita un seguro de vida se la clasifica según su esperanza de vida. La edad es el principal indicador, pero aún dentro del mismo grupo de edad la probabilidad de fallecimiento es mayor en unas personas que en otras. No se puede ofrecer un seguro a todo el mundo en los mismos términos basándose únicamente en la edad, ya que de lo contrario las primas no serían suficientes para cubrir las reclamaciones por siniestros. Por eso, las aseguradoras asignan una prima a cada individuo que refleja su nivel específico de riesgo y no el del grupo general de población al que pertenece.

En el seguro de vida, los riesgos cubiertos son de dos tipos: o bien el fallecimiento de la persona asegurada o bien su supervivencia a una determinada edad. Ambos son riesgos eventuales pues, pese a la certeza de la muerte, se desconoce su momento concreto. Además, la supervivencia no es segura y, por si fuera poco, se ignoran las circunstancias económicas en las que se va a alcanzar la edad objetivo.

Cuando se solicita un seguro de vida o un seguro de enfermedad, el aspecto más importante que la compañía aseguradora considera habitualmente es el estado de salud de la persona en ese momento y las perspectivas futuras para ver si tiene tantas posibilidades como cualquier otro individuo o no de desarrollar una enfermedad grave. La aseguradora consigue esta información haciendo preguntas y obteniendo datos objetivos acerca de la salud, el historial médico y los antecedentes familiares de la persona que desea contratar el seguro.

Los antecedentes familiares son importantes porque muestran si alguien presenta el riesgo de desarrollar una enfermedad hereditaria. Esa información, junto con la edad y el sexo se contrastan con el tipo de seguro solicitado, el volumen de la suma asegurada y la duración que se prevé para el seguro. Esta es el procedimiento mediante el cual las aseguradoras imputan a los clientes las primas correctas.

Asimismo, en el seguro de enfermedad el riesgo es la probabilidad de que el asegurado deba recibir cuidados médicos de diverso tipo, por causa de problemas en su salud o de carácter preventivo.

Al aplicar las pruebas genéticas en las distintas modalidades de aseguramiento, como posibles herramientas predictivas en relación directa los riesgos que se aseguran, se origina la controversia acerca de si esta práctica supondría una discriminación de las personas por razón de su mayor o menor susceptibilidad a padecer enfermedades cuyos motivos tienen base en el genoma. Se defiende esta idea como si fuese una realidad nueva dentro de los principios y procesos en los que se basa el aseguramiento (2, 3).

Lo cierto es que no es así; básicamente, asegurar es poner precio a un riesgo. Pero esta labor presupone, o mejor exige, la utilización de los todos los medios posibles para delimitar dicho riesgo. Por lo tanto, tanta discriminación sería, al menos en teoría, utilizar una prueba genética como elevar la prima por un seguro con cobertura de fallecimiento a una persona que tiene 70 años en comparación con otra que tiene 20. Otro tanto podría decirse de la realización, por ejemplo, de pruebas analíticas que permitirían discriminar unos pacientes frente a otros en base a la presencia de hipercolesterolemia, hiperglucemia, hepatopatías, etc.

La técnica aseguradora es lo suficientemente depurada como para ser capaz de abordar específicamente cada tipo de aseguramiento estableciendo para él un precio específico por su riesgo. De no proceder de este modo, se debería calcular el riesgo colectivo en su conjunto y repartirlo entre la totalidad de los asegurados a partes iguales, lo cual sería un notable paso atrás en la evolución del seguro además de una operación injusta y antieconómica cuyo resultado final sería el no aseguramiento de las personas en mejores condiciones de edad o de salud, que no se asegurarían como rechazo al sobrepago que dicho eventual sistema les impondría, generando la imposibilidad financiera de asegurar al resto, con el consiguiente perjuicio para la mayoría de la población asegurada.

Además, se debe tener en cuenta que la discriminación no radica sólo en dar un trato desigual a los iguales, sino también dar un trato igual a los desiguales (es discriminación, por ejemplo, exigir el mismo nivel de conocimientos a personas de formación diferente que optan a puestos de trabajo también diferentes). En este sentido, el esquema consistente en el reparto igualitario del riesgo colectivo entre todos los asegurados es, de hecho, una variante de discriminación (4, 5).

Existe una preocupación razonable de hasta qué punto los tests genéticos pueden predecir enfermedades, sobre todo teniendo en cuenta que el único test que en la actualidad se considera altamente predictivo y, por lo tanto, altamente relevante desde el punto de vista actuarial es el test de la enfermedad de Huntington.

La Enfermedad de Huntington constituye la patología prototípica que ya en la actualidad afecta de lleno al seguro de vida y al de enfermedad, ya que:

- | | | |
|--|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ❖ Es un desorden de tipo neuropsiquiátrico que suele presentarse en la edad adulta (entre los 35 y 55 años). La sintomatología pasa por cambios de personalidad, movimientos musculares involuntarios y torpeza. La enfermedad degenera en minusvalías de función cognitiva, que necesariamente conlleva el fallecimiento del paciente entre 15 y 20 años después de haberse presentado el | <p>primer síntoma (la muerte sobreviene habitualmente sobre los 57 años). Actualmente no hay tratamiento efectivo contra esta enfermedad.</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> ❖ En el Reino Unido, por ejemplo, la prevalencia de esta enfermedad oscila entre 6,4 y el 8,5 casos por cada 100.000 personas. <hr/> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Esta enfermedad conlleva un notable incremento de la siniestralidad. Se considera que aquellas personas con | <p>antecedentes familiares con Huntington tienen un 50% de posibilidades de ser portadores del gen de esta enfermedad.</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Esta enfermedad no sólo se debe a la mutación en un único gen sino que el tipo exacto de mutación permite predecir con bastante precisión si su desafortunado portador va a vivir hasta los 40, 45 o 50 años. |
|--|--|--|

4. La actitud del sector asegurador respecto de las pruebas genéticas

Existen varios tipos de respuesta por parte del sector asegurador dependiendo de las circunstancias, ya que:

- | | | |
|--|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ❖ Hay mercados aseguradores que no utilizan por el momento las pruebas genéticas, como es el caso del mercado español. <hr/> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Otros mercados han autorregulado, de forma privada, moratorias a dicho uso en tanto no se produzcan los adecuados avances | <p>médicos y legales en esta materia.</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Existen mercados que han regulado el uso de pruebas genéticas. En este punto se encuentran ejemplos como el canadiense, que intenta crear un organismo que será el único que conozca los resultados de las pruebas | <p>(que, por lo tanto, serán desconocidos para el asegurador, que sólo conocerá las consecuencias en materia de valoración del riesgo) y, sobre todo, el ejemplo británico, que se rige por reglas como:</p> |
|--|--|--|

- UNA COMISIÓN COORDINADA DESDE EL ÁMBITO PÚBLICO ES LA QUE ESTUDIA, CASO POR CASO, EL TIPO DE TEST GENÉTICO CUYA UTILIZACIÓN SE AUTORIZA. ESTA COMISIÓN FUE LA QUE APROBÓ, EN OCTUBRE DEL AÑO 2000, AL USO DE LA PRUEBA DIAGNÓSTICA ESPECÍFICA PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.
- LOS ASEGURADORES SE COMPROMETEN A NO EXIGIR A SUS POTENCIALES CLIENTES LA REALIZACIÓN DE PRUEBAS GENÉTICAS LIGADAS A LA OPERACIÓN DE SEGURO.
- LAS ASEGURADORAS ADQUIEREN EL DERECHO, RESPECTO DE LAS PRUEBAS DEFINIDAS POR LA MENCIONADA COMISIÓN, A PODER PREGUNTAR AL EVENTUAL CLIENTE SI SE HA REALIZADO LA PRUEBA GENÉTICA CORRESPONDIENTE Y, CASO AFIRMATIVO, POR LOS RESULTADOS. (6, 7, 8).

Por este motivo, la presencia de test genéticos, desde el punto de vista ético, tiene, por decirlo así, dos direcciones:

- LA COMPAÑÍA DE SEGUROS PUEDE UTILIZAR LOS RESULTADOS DEL TEST GENÉTICO PARA RECHAZAR RIESGOS QUE ANTES HABRÍA ASEGURADO O PARA TARIFICARLOS DE FORMA DISTINTA, PERO TAMBIÉN...
- EL CLIENTE PUEDE UTILIZAR EL TEST GENÉTICO COMO FUENTE DE ENRIQUECIMIENTO PATRIMONIAL, HECHO ÉSTE QUE REPELE LA INSTITUCIÓN ASEGURADORA, QUE ES MERAMENTE INDEMNIZATORIA. ESTO ES, UNA PERSONA QUE TIENE CONOCIMIENTO DE UNA DETERMINADA SENSIBILIDAD A UN MAL FÍSICO QUE RECORTA SUS ESPERANZAS DE VIDA PODRÍA APROVECHAR LA EVENTUAL CIRCUNSTANCIA DE QUE ESE DATO NO PUEDE SER CONOCIDO POR LAS COMPAÑÍAS DE SEGUROS PARA SUSCRIBIR UNA PÓLIZA EN LA QUE EL RIESGO ESTÁ INFRAVALORADO (HECHO ÉSTE, Y ES IMPORTANTE RECALCARLO, QUE EL CLIENTE CONOCE). DE LA MISMA FORMA, UNA PERSONA QUE OBTIENE DE UN TEST GENÉTICO LA CONSTANCIA DE UNA ESPERANZA DE VIDA ELEVADA PODRÍA CONSTITUIR UN SEGURO DE SUPERVIVENCIA PERCIBIDO EN RENTA VITALICIA, SIN QUE ESTE RIESGO FUESE ADECUADAMENTE VALORADO POR EL ASEGURADOR.

Por lo tanto, abordar la cuestión ética y legislativa del uso de los test genéticos es una labor que debe de tener en cuenta los dos puntos de vista, esto es, no sólo evitar la discriminación, sino también preservar la estabilidad del sistema de aseguramiento no permitiendo la antiselección. Lo que sí parece obvio es que a medida que vayan ganando en poder predictivo los tests genéticos, el seguro estará en disposición de establecer primas más exactas y, por tanto, más éticas también (9, 10, 11, 12).

El GAIC (Genetics and Insurance Committee) aprobó en septiembre del 2000 una propuesta de la ABI (Association of British Insurers) para la utilización del test genético que detecta la enfermedad de Huntington (o la mayor propensión a padecerla), en el proceso de suscripción de los riesgos de los seguros de vida. Toda la cuestión se limita a esta enfermedad, de mortalidad muy elevada. Pero lógicamente, nada impide que en el futuro se extrapole a otras enfermedades de detección genética. De ahí la polémica, aunque el GAIC haya declarado que cada test genético deba ser evaluado científicamente antes de que los aseguradores puedan hacer uso de los resultados.

En el supuesto que se decidiera prohibir la solicitud de pruebas genéticas a los efectos de obtener seguros de vida o enfermedad, lo que sucedería es que la gente que es consciente de su mayor riesgo de enfermedad procedería a contratar un seguro con cuantías y coberturas superiores a las que contrataría en circunstancias normales. En este contexto, si la compañía de seguros no está autorizada a solicitar pruebas genéticas para determinar la existencia de un mayor riesgo, concepto central e inherente a la naturaleza del seguro, perderá dinero o se verá obligada a incrementar la prima. Consiguientemente, el aumento de las primas hará que sean menos las personas que puedan permitirse el contratar un seguro, con perjuicio de la mayoría (13, 14, 15).

5. Utilización de pruebas genéticas por las compañías aseguradoras

Uno de los requisitos para la contratación de un seguro es la obligación por parte del asegurado de hacer una declaración sobre el estado de salud. Esto plantea un problema claro en el caso de los tests genéticos, habida cuenta de que en muchos casos se habla en términos de predisposición o susceptibilidad a padecer una determinada enfermedad, pero no de un padecimiento activo en el momento de la contratación.

A muchas personas les preocupa que el resultado de las pruebas genéticas pueda afectar a sus solicitudes de seguros de vida o enfermedad. Si una prueba pone de manifiesto que una persona tiene más probabilidades de contraer una determinada enfermedad, o de morir prematuramente en comparación con el resto de la población ¿qué consecuencias le puede acarrear a la hora de contratar un seguro?

El país de la Unión Europea y del mundo donde más a fondo se han analizado y debatido estas cuestiones es el Reino Unido, donde la Asociación de Aseguradoras Británicas (ABI) elaboró en 1997, con una posterior actualización en 1999, un Código de Conducta para regular el uso de los resultados de las pruebas genéticas por parte de sus miembros, mientras que el gobierno británico estableció el Comité de Ética y Seguros (*Genetics and Insurance Comité* o GAIC), constituido por expertos que representan los puntos de vista de científicos, médicos, aseguradoras y pacientes (16, 17, 18).

El principio clave del Código de Conducta es que el solicitante de un seguro tiene siempre la opción de someterse o no a pruebas genéticas y a) se permite su uso para la suscripción de seguros de vida, seguros de asistencia sanitaria y enfermedad y seguros de dependencia (*long term care*); b) se considera que su uso puede hacer que los clientes cuyo resultado dé negativo se vean beneficiados por menores niveles de prima. Se estima que la aprobación de estos tests permitirán moderar de forma sectorial el precio de las primas de seguros de vida para clientes con resultados normales a dicho test y c) esta decisión no implica que los clientes deban necesariamente realizarse el mencionado test para poder suscribir una póliza de seguro, sino que, en el caso de que los particulares, por sí mismos, ya dispongan de un resultado de dicho test, no hay nada que impida a las compañías aseguradoras utilizar dicha información.

> En el Reino Unido, las aseguradoras que deseen utilizar información de tipo genético para la suscripción de un riesgo han de seguir, necesariamente, el siguiente protocolo:

- LOS ASEGURADORES QUE DESEEN UTILIZAR INFORMACIÓN PROCEDENTE DE TEST GENÉTICOS PARA LA SUSCRIPCIÓN DE RIESGOS DEBEN CONTACTAR CON EL GAIC Y DAR LOS DATOS DE SU CLIENTE.
- LOS ASEGURADORES DEBEN CUMPLIR UNA SERIE DE REQUISITOS PARA OBTENER ESTA INFORMACIÓN: TRATARLA DE FORMA CONFIDENCIAL Y DESTRUIRLA CUANDO YA NO LA PRECISEN.
- LOS RESULTADOS DE ESTOS TESTS NO SERÁN VÁLIDOS PARA SEGUROS DE VIDA DE IMPORTES INFERIORES A 100.000 LIBRAS ESTERLINAS DESTINADOS A LA SUSCRIPCIÓN DE HIPOTECAS PARA LA COMPRA DE UNA CASA. SI UN CLIENTE ESCOGE ENSEÑAR EL RESULTADO DE SU TEST, ÉSTE SE IGNORARÁ, EXCEPTO SI ES A SU FAVOR.
- EN EL CASO DE LOS SEGUROS DE VIDA CON COBERTURA SUPERIOR AL MEDIO MILLÓN DE LIBRAS, LA COMPAÑÍA ASEGURADORA PODRÁ EXIGIR QUE EL SOLICITANTE DEL SEGURO DECLARE EL RESULTADO DE TODA PRUEBA GENÉTICA QUE HAYA PODIDO REALIZAR. ESTO HA SIDO EL RESULTADO DE UNA MORATORIA, CON VALIDEZ HASTA EL 2006, PACTADA ENTRE EL GOBIERNO BRITÁNICO Y EL SECTOR ASEGURADOR. (19, 20).

6. El debate ético

Tanto el Convenio del Consejo de Europa de 4 de abril de 1997 sobre Derechos Humanos y Biomedicina (art. 5, 10.1 y 12) como la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos, de 11 de noviembre de 1997 de la UNESCO (art. 5, b), establecen inequívocamente que en todos los casos se recabará el consentimiento previo, libre e informado de la persona interesada, como derecho fundamental del individuo (21, 22, 23).

En este contexto, la UNESCO promulgó en octubre de 2003 una declaración internacional sobre protección de datos genéticos humanos con el ánimo de evitar el uso discriminatorio de los genes que predisponen a diversos tipos de enfermedades, incluyendo a aquellos implicados en determinados rasgos de comportamiento como la inteligencia, la agresividad y las tendencias depresivas. El anteproyecto, redactado por el comité de bioética del organismo internacional, establece en su articulado que los datos genéticos humanos no podrán ser utilizados con propósitos discriminatorios, ni de manera tal que puedan provocar la estigmatización de una persona, familia o grupo étnico.

Los expertos de la UNESCO recogen así una grave preocupación expresada insistentemente desde hace años por científicos, eticistas y juristas: la posibilidad de que las empresas y las compañías de seguros de vida y enfermedad y quizá también de automóviles accedan a los datos genéticos de los individuos, obtenidos por lo general con fines médicos, y los utilicen para tomar decisiones sobre contrataciones, ascensos, despidos y pólizas.

Las pruebas médicas que analizan las variaciones genéticas de los individuos están creciendo exponencialmente a raíz de la secuenciación del genoma humano, que facilita enormemente su obtención y análisis. Las bases de datos están dispersas en cientos de laboratorios y hospitales de cada país, y la universalización del análisis genético es sólo cuestión de tiempo: el Reino Unido anunció en junio de 2003 un plan de 70 millones de euros que permitirá, entre otras cosas, archivar el perfil genético de todos los recién nacidos.

La agencia de la ONU señala que los datos genéticos se obtienen casi siempre con fines diagnósticos, o en el curso de programas de investigación biomédica y contienen información cuya importancia no se conoce forzosamente en el momento que se extraen las muestras biológicas, es decir, los avances en genómica permiten analizar y archivar los genes cruciales para la enfermedad actual del individuo y los que dentro de diez años se demostrarán en ese momento relevantes para predecir futuras patologías.

La UNESCO exige que los datos genéticos sean recolectados, tratados, utilizados y conservados mediante procedimientos transparentes, y la creación de comités de ética independientes que asesoren a los gobiernos sobre estos temas. Asimismo, considera preceptivo obtener el consentimiento de la persona tras suministrarle una información clara, objetiva y exhaustiva, especificando con qué finalidad exacta se analizan sus genes, por lo que los datos genéticos recogidos con fines médicos o científicos no deberán utilizarse para otra finalidad sin consentimiento del individuo.

7. Planteamientos jurídicos

La regulación legal del uso de los test genéticos, por fuerza, deberá producirse sobre una realidad cambiante, por lo que no resulta racional esperar que las normas den hoy una respuesta permanentemente válida. No obstante, el Estado español ha dado ya pasos en este sentido a través de la ratificación del Convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la biología y la medicina, hecho en Oviedo el 4 de abril de 1997 (publicado en el BOE de 20 de octubre de 1999), y conocido como **Convenio de Oviedo**, que establece de forma clara que el interés y el bien del ser humano deben prevalecer sobre el solo interés de la sociedad y la ciencia.

El artículo 12 de dicho convenio textualmente dispone: *Sólo podrán hacerse pruebas predictivas de enfermedades genéticas o que permitan identificar al sujeto como portador de un gen responsable de una enfermedad o detectar una predisposición o una susceptibilidad genética a una enfermedad con fines médicos o de investigación médica y con un asesoramiento genético adecuado.*

Por tanto, el citado convenio únicamente autoriza pruebas predictivas en relación con las siguientes circunstancias:

- UNA ENFERMEDAD GENÉTICA EXISTENTE.
- SER PORTADOR DE UN GEN RESPONSABLE DE UNA ENFERMEDAD.
- PREDISPOSICIÓN O SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA A PADECER UNA DETERMINADA ENFERMEDAD.

Dada la necesidad de respeto a la prevalencia de los intereses individuales y el derecho a la libertad, el proceso de realización de un test genético debe ajustarse a las exigencias contempladas en la **Ley General de Sanidad**, de 1986, entre las que se encuentran el consentimiento informado, que debe incluir información relativa a la naturaleza de los análisis, los objetivos perseguidos con la prueba y las consecuencias y los tratamientos que se pueden aplicar en caso de un resultado positivo.

Adicionalmente, con el consentimiento se establece que el control de los datos obtenidos corresponde al titular. El individuo tiene derecho a decidir por sí mismo sobre la utilización de los datos con la potestad de poder acceder a los mismos, al tiempo que controlar su existencia y veracidad y autorizar su revelación. Esto consagra la prevalencia del derecho a la intimidad genética sobre cualquier otro derecho. Ninguna persona física, ni entidades públicas o privadas, deberán tener derecho a analizar la información genética de una persona sin su consentimiento. El propietario de la información genética es la persona física. Por tanto, cualquier decisión relativa a la difusión de dicha información a terceros, incluyendo a los familiares genéticos, debe ser estrictamente personal (24).

Sin embargo, una posibilidad alternativa coherente con la libertad del individuo estriba en el derecho a no saber. Si se asume que el titular de los datos tiene el derecho a informar a terceros, parece lógico que también tenga el derecho a la ignorancia, es decir, a que prefiera no conocer el resultado de una determinada prueba genética.

La **Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal**, amplía la protección a toda clase de datos de carácter personal, y no sólo a los informatizados, lo que permite su aplicación a cualquier material de origen biológico que contenga información personal identificable, y legitima la existencia de bases de datos genéticos con registros informáticos para la detección, seguimiento y consejo de personas con alto riesgo de transmitir un trastorno genético grave a su descendencia.

Esto conlleva a que si se establecen registros genéticos, el almacenamiento de datos debería ser voluntario y se debería garantizar la estricta confidencialidad de los datos almacenados. Los responsables del sistema deben garantizar la imposibilidad de acceder a los datos genéticos personales, su destrucción o difusión sin el consentimiento expreso de la persona titular de dichos datos (25).

Por otra parte, la **Ley 50/80, de 8 de octubre, de Contrato de Seguro**, define dicho contrato como una relación presidida por la buena fe de las dos partes y, más en concreto, en su artículo 10 obliga al tomador del seguro a declarar al asegurador, de acuerdo con el cuestionario que éste le someta, todas las circunstancias por él conocidas que puedan influir en la valoración del riesgo. La racionalidad de este precepto es evidente y su modificación, inabordable.

De no existir un mecanismo mediante el cual el futuro cliente de un seguro no venga obligado a expresar las circunstancias que conoce y que influyen en el riesgo (la vida, la supervivencia, el estado de salud), se producirá un fenómeno masivo de antiselección o selección adversa, que no es otra cosa que la adquisición de riesgos por las aseguradoras a precios anormalmente bajos, puesto que a las compañías se les impediría obtener la información destinada ineludiblemente a la elevación del precio de la prima, lo cual, al final del proceso, produciría la insolvencia financiera del sistema y la imposibilidad de proseguir el aseguramiento.

En principio, y dentro del actual marco regulatorio, la información que puede recabar la aseguradora está en función de la información que ofrezca el asegurado, por lo que se asume que el contrato de seguro es un acto de buena fe, por lo que en la realidad, existe un cierto vacío legal en lo referente a tests genéticos y contratos de seguro.

8. La polémica

La información que podría obtenerse como consecuencia de la realización de pruebas genéticas plantea problemas relativos a esa misma información, a su acceso y a su utilización, pues pueden entrar en conflicto los intereses del individuo afectado con los de otras personas o entidades.

Las inquietudes se centran en decidir quién, bajo qué circunstancias y con qué objetivos se podrán realizar análisis genéticos tras la obtención de muestras biológicas para su realización; quién tendrá acceso a información obtenida, a quién podrá comunicarse y en qué circunstancias, qué utilización se podrá dar a la misma, qué medidas de protección de la información deberían adoptarse, etc.

La polémica en el Reino Unido, y a nivel europeo, viene del hecho de que, en la práctica, se ha habilitado a las aseguradoras a obtener información de tipo genético de posibles futuros clientes sin precisar del consentimiento previo de éstos.

Sobre este antecedente, se podría considerar que este precedente británico podría llegar a contravenir los artículos 11 y 12 del *"Convenio europeo para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la biología y de la medicina"*, ratificado por España el 23 de julio de 1999:

ARTÍCULO 11

No discriminación: Se prohíbe toda forma de discriminación de una persona a causa de su patrimonio genético.

ARTÍCULO 12

Pruebas genéticas predictivas: "Sólo podrán hacerse pruebas predictivas de enfermedades genéticas o que permitan identificar al sujeto como portador de un gen responsable de una enfermedad o detectar predisposición o una susceptibilidad genética a una enfermedad, con fines médicos o de investigación médica".

No obstante, el Reino Unido no viola este último artículo, por cuanto sutilmente, no obliga a un cliente potencial a hacerse la prueba genética que pudiera ser requerida, ya que lo violaría porque no sería con fines médicos, pero en cambio permite que las aseguradoras accedan a esta información para la selección de riesgos, cuando el cliente, como parte de su historial médico, ya se ha hecho la prueba, y todo ello sin consentimiento del cliente.

Lo que resulta innegable es que la determinación precisa de los riesgos de salud individuales conduce a exactitud en el cálculo de las primas a satisfacer, gracias al cálculo actuarial, y a un mercado asegurador eficiente.

No obstante, existe una gran preocupación acerca de si los tests genéticos pudieran ser mal utilizados por los aseguradores privados, discriminando entre individuos de alto y bajo riesgo.

La discusión ética se centra en la naturaleza y valor predictivo del test, en los requerimientos para llevar a cabo los tests y en la revelación de los resultados.

Se ha argumentado que ya que el perfil genético individual está fuera del control de la persona, ésta no debería ser discriminada negativamente a resultados de un test genético. Esta línea de opinión no parece ser excesivamente consistente, de cara a la fijación de primas de vida o enfermedad, ya que hoy en día se declara rutinariamente, a la hora de contratar un seguro, el sexo y la historia familiar de enfermedades, lo que ya supone de por sí un marcador indirecto de susceptibilidad de índole genética (26).

Por otra parte, el individuo, en determinados casos, puede influir en las consecuencias negativas de la existencia de determinados genes, como sucede por ejemplo en el caso de la diabetes tipo 2, de fuerte predisposición genética, pero cuyas complicaciones pueden reducirse mediante hábitos de vida saludables.

Por tanto, los resultados de tests de laboratorio convencionales tales como el nivel de colesterol, influido por la genética del individuo, debería permanecer confidencial, al igual que la historia familiar de enfermedades, ligada a la genética, que abona la teoría de que los tests genéticos no implican ningún planteamiento ético conceptualmente diferencial en relación con las prácticas comúnmente aceptadas llevadas a cabo por las compañías aseguradoras (27).

9. Pruebas genéticas y aseguramiento en Europa

En la práctica totalidad de países europeos se están poniendo en práctica en los últimos años normativas y recomendaciones para el empleo correcto de las pruebas genéticas. Entre las recomendaciones más significativas y generalizadas en los países de la U.E. se podrían destacar las siguientes:

- | | | |
|---|---|---|
| ❖ Las pruebas genéticas deberán siempre ser realizadas e interpretadas por equipos competentes y cualificados. | ❖ Las pruebas genéticas han de ser realizadas de forma voluntaria, autónoma, confidencial, tras consentimiento informado y bajo un estricto código ético. | ❖ La realización de pruebas debe ir siempre acompañada de un consejo genético cualificado realizado por expertos. |
| ❖ Las pruebas genéticas no deben realizarse de forma indiscriminada y han de ser diseñadas para cada individuo con fines predictivos, preventivos, diagnósticos o terapéuticos. | ❖ Las pruebas genéticas no deben servir para la inducción de ningún tipo de discriminación social o laboral. | ❖ Tanto los médicos como la población en general deben ser educados en la utilización de pruebas genéticas. |

Para la revisión de la normativas cambiantes en los distintos países europeos se ha empleado el estudio realizado por la Sociedad Europea de Genética Humana (ESHG) el 31 de diciembre de 2000, el cual se ha completado con la información recabada por la Unión Española de Entidades Aseguradoras y Reaseguradoras (UNESPA) al Comité Europeo de Seguros (CEA) y a las asociaciones nacionales de aseguradoras de Alemania, Dinamarca, Grecia, Holanda, Reino Unido y Suiza.

> Régimen legal de los países de la UE:

ALEMANIA

- ❖ La ley de contrato de seguro no regula el uso de pruebas genéticas en las operaciones de seguro. El principio de libertad contractual permite a la aseguradora solicitar cualquier tipo de prueba para medir el riesgo. (Ver anexo 1).
- ❖ Las entidades aseguradoras acordaron, de manera extraoficial, una moratoria en 1988, que ha sido prorrogada hace relativamente poco tiempo, y según la cual no se solicitarán pruebas genéticas como requisito previo a la contratación del seguro.

AUSTRIA

- ❖ **Ley sobre Tecnología Genética de 1994:** prohíbe expresamente el uso por parte de las entidades aseguradoras de información genética o resultados de pruebas de este tipo que afecten a los tomadores o solicitantes de seguro. No obstante dicha prohibición, la parte solicitante podrá emplear las pruebas genéticas que ya obren en su poder para obtener unas condiciones de aseguramiento más favorables.

BÉLGICA

- ❖ **Ley sobre Contrato de Seguro de 1992:** prohíbe llevar a cabo pruebas genéticas que puedan predecir el futuro estado de salud del solicitante del seguro. Los solicitantes de seguro no podrán, en ningún caso, presentar el resultado de pruebas genéticas anteriores.

DINAMARCA

- ❖ **Ley sobre Protección de Datos Personales de Carácter Sensible de 1992:** requiere el control estricto por parte del individuo del uso y almacenamiento de sus datos médicos y biomédicos.
- ❖ **Ley sobre Información Sanitaria en el Mercado Laboral de 1996:** prohíbe a los empresarios solicitar pruebas genéticas a sus empleados.
- ❖ **Ley sobre Contrato de Seguro de 1997:** permite a las entidades aseguradoras exigir a los solicitantes de seguros la prueba del VIH, así como la aportación del historial sanitario familiar, cuando la cantidad asegurada supere ciertos límites.
- ❖ Dinamarca es de los pocos países (junto con España y Grecia) que ha ratificado hasta ahora el Convenio del Consejo de Europa para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina, hecho en Oviedo el 4 de abril de 1997. Dicho Convenio prohíbe en su artículo 11 toda forma de discriminación de una persona a causa de su patrimonio genético y solicita al Gobierno la elaboración, a través del recién creado Comité de Ética en Investigación Científica y Tecnológica, de un informe sobre los aspectos éticos, sociales y jurídicos que se puedan derivar de los descubrimientos en el área de la genómica y proteómica. El artículo 12 excluye la práctica de pruebas genéticas con fines distintos de los médicos o de investigación médica.



ESPAÑA

- ❖ **Constitución Española** de 1978: establece en su artículo 14 la prohibición de discriminación por razón de cualquier condición o circunstancia social o personal.
- ❖ **Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal de 1999**: establece medidas de protección especial para los datos de tipo médico en sus artículos 7.3 y 8.
- ❖ España ratificó, por medio de Instrumento publicado en el BOE de 20 de octubre de 1999, el **Convenio del Consejo de Europa para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina, hecho en Oviedo el 4 de abril de 1997**.
- ❖ **Moción aprobada por el Pleno del Congreso de los Diputados el 6 de marzo de 2001** por la que se insta al Gobierno a que desarrolle los términos contenidos en los artículos 10, 11 y 12 y en el Capítulo V todos del Convenio del Consejo de Europa para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina, hecho en Oviedo el 4 de abril de 1997, impulsando, en cuanto sean necesarios, cambios en la legislación sectorial, a fin de garantizar eficazmente los derechos a la privacidad y a la no discriminación por razones genéticas, así como establecer los efectos derivados de su vulneración. Asimismo, se solicita la constitución de un grupo de trabajo para el estudio del valor actuarial de la información genética, de sus efectos económicos sobre el contrato de seguro y de las consecuencias que pudieran derivarse de la posible utilización futura de las pruebas genéticas, así como para la propuesta de medidas que, en su caso, garanticen tanto el respeto a los derechos de la intimidad personal y a la no discriminación de los asegurados, y promuevan los principios de lealtad, veracidad y buena fe que presiden las relaciones derivadas del contrato de seguro, en atención a su específica naturaleza.

FINLANDIA

- ❖ **Ley sobre la Protección de los Datos de carácter Personal y de Confidencialidad de los Datos Médicos de 1987**: establece el control estricto del uso y tratamiento de la información genética por parte del afectado.
- ❖ **Ley de Protección de Datos de Carácter Personal de 1999**: permite el tratamiento de datos médicos para fines de investigación científica una vez obtenido el consentimiento expreso de la parte afectada.
- ❖ No existe ninguna ley en su ordenamiento que regule las pruebas genéticas en el ámbito del seguro. Las entidades aseguradoras acordaron una moratoria en 1999, en virtud de la cual las compañías no harán preguntas al solicitante sobre cuestiones genéticas o sobre el historial sanitario familiar a la hora de valorar el riesgo.

FRANCIA

- ❖ **Ley sobre respeto al Cuerpo Humano** de 1994 por la que se desarrollan determinados artículos del Código Civil: establece que las pruebas genéticas únicamente podrán realizarse con fines estrictamente médicos o de investigación científica. Esta ley no impide a las compañías aseguradoras acceder a la información genética ya existente en el historial médico del solicitante de seguro.
- ❖ Las entidades aseguradoras acordaron en 1994 una moratoria de cinco años, que ha sido ampliada por un plazo de otros cinco años, según la cual no se utilizará la información genética disponible para determinar la "asegurabilidad" de los solicitantes aun cuando dicha información sea facilitada voluntariamente por éstos.

GRECIA

- ❖ En la actualidad no existe legislación específica en la materia. Existe un acuerdo no escrito, que respetan la mayoría de las compañías aseguradoras, por el que se comprometen a no solicitar pruebas genéticas.

HOLANDA

- ❖ El Consejo de Sanidad holandés estableció en 1989 la necesidad de obtener el consentimiento de la persona afectada para cualquier uso de sus datos genéticos.
- ❖ Está actualmente en vigor la moratoria de cinco años (ver Anexo III) acordada por las compañías aseguradoras en 1990 e implantada con carácter indefinido a partir de 1995. Según la misma, las aseguradoras no podrán solicitar pruebas genéticas como condición previa a la contratación de un seguro y únicamente podrán solicitar los resultados de pruebas genéticas realizadas con anterioridad cuando la cifra asegurada supere los 150.000 euros para seguros de vida y los 30.000 euros para seguros de invalidez. Dichas pruebas incluyen las pruebas efectuadas a los familiares del solicitante que demuestren que éstos padecen enfermedades de tipo hereditario como la enfermedad de Huntington, por ejemplo. Se prevé que la moratoria podrá ser cancelada, con un aviso previo de dos años, en caso de que aparezcan nuevos avances científicos en este campo que desaconsejen mantener la misma.

IRLANDA

- ❖ **Ley de Contrato de Seguro:** prohíbe la solicitud de pruebas genéticas por parte de las aseguradoras.

ITALIA

- ❖ No tienen ninguna ley específica en materia de pruebas genéticas. Únicamente se aplica el principio de privacidad de los datos médicos. El Comité Italiano de Bioética ha establecido que la información genética debe de ser sometida a dicho principio, de modo que se prohíbe el uso de esta información sin el consentimiento expreso de la parte afectada.

PORTUGAL

- ❖ No tienen ninguna ley específica en materia de pruebas genéticas. El Ministerio de Sanidad ha publicado algunas directrices que abogan por la confidencialidad de los resultados derivados de estas pruebas.

REINO
UNIDO

- ❖ No existe legislación en la materia, que en la actualidad es objeto de autorregulación a nivel sectorial, mediante un código de práctica, de carácter voluntario, válido hasta 2006, mediante el cual las compañías no pueden obligar a la revelación de los resultados de tests genéticos.
- ❖ **Código de conducta en materia de tests genéticos elaborado por la Asociación Británica de Aseguradoras (ABI):** publicado en 1997 y modificado en 1999 y en el 2001, en el cual se establece que las entidades aseguradoras no exigirán, como requisito previo a la suscripción de un contrato de seguro, que el solicitante se someta a una prueba genética. Como excepción a la anterior regla, los solicitantes de un seguro de vida de hasta 158.982 euros, directamente vinculado a un préstamo hipotecario para la adquisición de una nueva vivienda por las personas que suscriben el seguro, no tendrán que presentar el resultado de sus pruebas preexistentes. Cabe decir, que las aseguradoras podrán elevar dicho límite máximo. Esta excepción se ha extendido, por acuerdo de las aseguradoras, a todas las categorías de seguro incrementándose el tope hasta 482.315 euros. La extensión de la moratoria se aplica a todas las solicitudes de seguro que se hayan realizado a partir del 1 de mayo del año 2001.
- ❖ El código prohíbe expresamente el uso de las pruebas genéticas de una persona en la evaluación del perfil de riesgo de otra persona distinta. Además, el código de conducta establece que, únicamente podrán tenerse en cuenta por parte de los miembros de la Asociación, los resultados de aquellas pruebas genéticas preexistentes cuya validez haya sido establecida actuarialmente por el Comité independiente sobre Genética y Seguros (órgano multidisciplinar creado por el gobierno británico que se compone de expertos en genética, representantes del sector asegurador, actuarios y representantes de las personas que padecen enfermedades de transmisión hereditaria). El criterio general expresado por dicho Comité en su informe de junio de 2000 es dar validez actuarial a aquellas pruebas genéticas que demuestren que el riesgo de mortalidad se incrementa en un 50% para los solicitantes de seguros de vida y en un 25% para los solicitantes de otros seguros. En la actualidad, el Comité únicamente ha autorizado el acceso por parte de las aseguradoras a los resultados de la prueba genética conducente a la detección de la enfermedad de Huntington.
Cabe decir que nada impide que un solicitante de seguro de vida aporte el resultado de aquellas pruebas genéticas negativas cuando exista un historial familiar que establezca una predisposición a padecer ciertas enfermedades.
- ❖ **Decisión del Comité independiente sobre Genética y Seguros relativa al uso de las pruebas genéticas para la valoración del riesgo en el seguro de vida con respecto a la enfermedad de Huntington de 28 de septiembre de 2000:** en virtud de la cual se aprueba el uso del resultado de pruebas genéticas preexistentes sobre la enfermedad de Huntington a la hora de suscribir un seguro de vida. El Comité establece en su decisión que existe evidencia actuarial que avala que las personas que padecen este tipo de enfermedad tienen un riesgo adicional de mortalidad superior al 50%. Las entidades aseguradoras que quieran emplear el resultado de este tipo de pruebas deberán de informar de ello al Comité para su aprobación.
- ❖ La Asociación Británica de Aseguradoras ha presentado otra serie de pruebas genéticas cuya aprobación está actualmente estudiando el Comité independiente sobre Genética y Seguros.



SUECIA

- ❖ **Ley sobre uso de Ciertas Tecnologías Genéticas de 1991:** prohíbe el uso de pruebas genéticas para fines que no sean estrictamente médicos.
- ❖ La asociación que representa al sector asegurador y el gobierno sueco suscribieron un acuerdo el 1 de julio de 1999, en virtud del cual las entidades aseguradoras se comprometen a no solicitar pruebas genéticas previas a sus futuros asegurados ni requerir la presentación por estos de pruebas genéticas anteriores a la hora de suscribir un seguro de vida o de enfermedad. Dicho acuerdo tenía en principio validez hasta el 31 de diciembre de 2002, previéndose su posible cancelación con un preaviso de seis meses. Existen excepciones al acuerdo para el caso de pruebas genéticas realizadas con anterioridad a la solicitud del seguro, tanto del solicitante como de sus familiares, cuando:
 - a) La prestación en caso de fallecimiento del afectado, a pagar en forma de capital exceda en quince veces "la cuantía de precio base", unos 63.000 €, tal y como establece su Ley de Contrato de Seguro.
 - b) La prestación en caso de fallecimiento del afectado, a pagar en forma de renta periódica, sea superior a "la cuantía de precio base" tal y como establece su Ley de Contrato de Seguro (alrededor de 5.000 €).
 - e) La prestación cuando enferme el afectado, a pagar en forma de capital, exceda en quince veces "la cuantía de precio base" (unos 13.000 €), tal y como establece su Ley de Contrato de Seguro.
 - d) La prestación cuando enferme el afectado, a pagar en forma de renta periódica, sea superior a "la cuantía de precio base" (unos 5.000 €), tal y como establece su Ley de Contrato de Seguro.

> Régimen legal en otros países europeo**NORUEGA**

- ❖ **Ley sobre la aplicación de la Biotecnología en la Medicina de 1994:** establece que las pruebas genéticas únicamente podrán realizarse con fines estrictamente médicos. Se prohíbe la solicitud, recepción o utilización de información derivada de pruebas genéticas. Asimismo, está prohibido solicitar pruebas genéticas que ya obren en poder de la persona.

SUIZA

- ❖ **Ley de Contrato de Seguro:** establece la obligación de facilitar toda información que pueda influir en el contenido del contrato por parte del asegurado.
- ❖ **La Constitución federal suiza de 1992** establece en su artículo 119 que la información sobre la herencia genética de la persona únicamente podrá ser registrada, analizada o divulgada con el consentimiento de ésta o por mandato legal.
- ❖ Las entidades del sector acordaron, de manera extraoficial en 1994, una moratoria en la solicitud de información genética que seguirá en vigor en tanto y en cuanto no se apruebe una ley sobre pruebas genéticas. En dicho acuerdo se estable como regla general que las compañías aseguradoras se abstendrán de exigir el sometimiento de los solicitantes de seguros a pruebas genéticas como condición previa a la contratación del seguro. No obstante lo anterior, el solicitante está obligado a la presentación de las pruebas preexistentes a las que se hubiese sometido las cuales influirán en el cálculo de la prima por parte de la entidad aseguradora.

10. Conclusiones:

- a) El debate científico, jurídico y ético en torno a las pruebas genéticas no ha hecho más que empezar, y alcanzará su punto álgido a lo largo de la segunda década de este siglo cuando los avances en genómica hagan posible el despistaje genético de muchas enfermedades frecuentes y de gran impacto en la morbimortalidad de la población de forma rápida, fiable y costo-efectiva.
- b) Las nuevas tecnologías son percibidas de forma amenazadora por amplios estratos de la población, y es un hecho que los tests genéticos alterarán significativamente el cálculo actuarial para el futuro cálculo de primas de vida y enfermedad. Asegurar riesgos de acuerdo con pruebas genéticas supondrá de alguna forma establecer una división de origen entre las personas que seguirá siendo objeto de apasionados debates.
- c) Asegurar a partir del rigor estadístico, de la prevalencia de enfermedades o de la presencia de determinados hábitos de vida parece razonable y fuera de toda discusión; en cambio, asegurar en base a las conexiones entre código genético y el desarrollo de determinadas enfermedades tropieza con serios escollos jurídicos éticos y de opinión pública.
- d) El seguro se basa en la asunción de riesgo por parte del asegurador. Se aseguran riesgos, no certezas. Este concepto clave empresarial podría verse en peligro en el futuro por los avances de la genómica en los dos polos opuestos: por una parte, si al asegurador se le veta el acceso a la información genética relevante, se producirá una asimetría de información a favor de los asegurados de alto riesgo que podría llevar a la larga a la quiebra de las compañías aseguradoras por acumulación de siniestros (selección adversa o negativa del riesgo), o a la subida exponencial de primas, con el consiguiente perjuicio para el resto de la población asegurada. En cambio, si el asegurador pudiera llegar a descartar el grueso del riesgo en su cartera de asegurados a través de la realización generalizada de pruebas genéticas, el concepto asegurador quedaría en gran medida desvirtuado. Estos escenarios hipotéticos involucrarán en el tiempo antes al seguro de vida, ligado directamente a la mortalidad de la cartera, que al seguro de enfermedad, más influido por la morbilidad de sus asegurados.
- e) En la actualidad, la posibilidad de vincular el status genético de un individuo con riesgos de padecer determinadas patologías en el futuro es todavía más teórico que real aunque no será así en un futuro quizá no demasiado lejano. El valor predictivo de las pruebas genéticas es limitado incluso cuando se trata de enfermedades monogénicas y mucho más todavía en el caso, mayoritario, de las poligénicas. Incluso aunque se llegase a conocer perfectamente la base genética de la patología, los factores ambientales y el estilo de vida limitarían considerablemente el valor predictivo de las pruebas genéticas.
- f) Las pruebas genéticas deberían ser realizadas por médicos con la suficiente formación, adoptándose las medidas oportunas de control de calidad.
- g) No conviene olvidar que los seguros, ya sean de vida, enfermedad o automóvil constituyen servicios públicos de titularidad privada, no garantizados constitucionalmente para todos los ciudadanos, cuya contratación es estrictamente voluntaria y sujeta a la aceptación por parte del tomador del seguro de unos condicionantes que deben limitar necesariamente el ámbito de aplicación del seguro. De ahí que no puedan plantearse en este campo principios de justicia distributiva o equidad aplicables en otros contextos a todos los ciudadanos.
- h) Aunque sean percibidos como tests diferentes de los demás, los tests genéticos que vayan siendo incorporados a la práctica clínica deberán ser tratados de igual forma que los tests no genéticos, sin establecer diferencias de carácter ético y científico entre unos y otros, con la salvedad de existir una diferencia clave entre un test genético y una prueba diagnóstica cualquiera, dado que esta última sólo tiene validez en el momento de su realización, mientras que el diagnóstico molecular es para toda la vida.



- i)** El individuo debe ser titular de todos los derechos relativos a la información de carácter genético, y el médico debe custodiar los datos de acuerdo con las normas del secreto profesional, asegurando el respeto estricto a la confidencialidad de la información genética.
- j)** En ningún caso debería ser obligatorio en el contexto asistencial realizar una prueba genética. Las únicas excepciones deberían ser las pruebas genéticas que, en el contexto de procesos civiles o penales, sean necesarias para una identificación positiva.
- k)** Deben ser prohibidas las pruebas genéticas como requisito para obtener o mantener un puesto de trabajo, pero podrían llevarse a cabo de forma voluntaria para identificar los riesgos potenciales en el puesto de trabajo.
- l)** Los planteamientos médicos, éticos y legales en relación con la utilización de pruebas genéticas no podrán esculpirse en piedra; deberán ser revisados y corregidos periódicamente a medida que avanza la ciencia y evoluciona la sociedad, y en esto la comunidad médica deberá jugar un papel clave en concienciar a los pacientes y, por tanto, a la opinión pública acerca del correcto uso de estas nuevas tecnologías.

○ Bibliografía

1. Gómez Gallego, F.: El estudio del ADN en Medicina: Aplicaciones clínicas frente a implicaciones éticas. En: Cuadernos del Master en Derecho Sanitario. Banderas F., Delgado S., Ruiz de la Cuesta JM., Sánchez Caro J. 2002 Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina. Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria.
2. Mould, A.: Implications of genetic testing: discrimination in life insurance and future directions. *J Law Med*. 2003 May; 10(4):480-487.
3. Nowlan, W.: Human genetics. A rational view of insurance and genetic discrimination. *Science*. 2002 Jul 12; 297 (5579):195-6.
4. Bonn, D.: Genetic testing and insurance: fears unfounded? *Lancet*. 2000 Apr 29; 355(9214):1526.
5. Murthy, A.; Dixon, A.; Mossialos, E.: Genetic testing and insurance. *J R Soc Med* 2001; 94:57-60.
6. Raeburn, S.: Implications of genetic testing for the insurance industry: the UK example. *Community Genet*. 2002 Oct; 5 (2):102-9.
7. Delatycki, M.; Allen, K.; Williamson, R.: Insurance agreement to facilitate genetic testing. *Lancet*. 2002 Apr 20; 359 (9315):1433.
8. Hoel, M.; Iversen, T.: Genetic testing when there is a mix of compulsory and voluntary health insurance. *J Health Econ*. 2002 Mar; 21 (2):253-70.
9. Launis, V.: The use of genetic test information in insurance: the argument from indistinguishability reconsidered. *Sci Eng Ethics*. 2000 Jul; 6 (3):311-4.
10. Matloff, E. T.; Shappell, H.; Brierley, K.; Bernhardt, B. A.; McKinnon, W.; Peshkin, B. N.: What would you do? Specialists' perspectives on cancer genetic testing, prophylactic surgery, and insurance discrimination. *J Clin Oncol*. 2000 Jun; 18 (12):2484-92.
11. Strohmenger, R.; Wambach, A.: Adverse selection and categorical discrimination in the health insurance markets: the effects of genetic tests. *J. Health Econ*. 2000 Mar; 19 (2):197-218.
12. Raithatha, N.; Smith, R.: Disclosure of genetic tests for health insurance: is it ethical not to? *Lancet* 2004; 363:395-6.
13. Hall, M. A.; Rich, S. S.: Patient's fears of genetic discrimination by health insurers: the impact of legal protections. *Genet Med* 2000; 2: 214-21.
15. Department of Health. Genetics White Paper. <http://www.gov.uk/genetics/whitepaper.htm> (accessed Feb 20, 2004).
14. House of Commons, Science and Technology Committee. Genetics and Insurance, 5 th. Report. 2001 London, Stationery Office.
16. United Kingdom. Department of Health. Genetics and Insurance Committee (GAIC). Genetics and insurance. *Bull Med Ethics*. 2002 Mar; (176):19-24.
17. Murthy, A.; Dixon, A.; Mossialos, E.: Genetic testing and insurance. *J R Soc Med*. 2001 Feb; 94(2):57-60.
18. Hall, M. A.; Rich, S. S.: Patients' fear of genetic discrimination by health insurers: the impact of legal protections. *Genet Med*. 2000 Jul-Aug; 2 (4):207-8.
19. Association of British Insurers. Genetic testing: ABI code of practice. London: Association of British Insurers; 1999.
20. Cook, D. E.: Genetics and the British insurance industry. *J Med Ethics* 1999; 25:157-162.
21. Anderlik, M. R.; Lisko, E. A.: Medicolegal and ethical issues in genetic cancer syndromes. *Semin Surg Oncol*. 2000 Jun; 18 (4):339-46.
22. Lacadena, J. R.: Genética y Bioética. Madrid: Universidad Pontificia Comillas; 2002.
23. Guttmacher, A.; Collins, F.: Ethical, Legal and Social Implications of Genomic Medicine. *N Engl J Med* 2003; 349:6 562-569.
24. Romeo Casabona, C. M.: El tratamiento y la protección de los datos genéticos. En Genética. Mayor Zaragoza, F y Alonso Bedate, C (eds). Madrid : Ed. Ariel; 2003.
25. Moreno, R. F.: Información genética (informgenics) e intimidad, in El Derecho ante el Proyecto Genoma Humano. 1994, Fundación BBV: Madrid.
26. Pokorski, R. J.: Insurance underwriting in the genetic era. *Am J Hum Genet* 1997;60: 205-16.
27. Rothstein, M. A.; Anderlik, M. R.: What is genetic discrimination and when and how can it be prevented? *Genet Med* 2001; 3:354-8.



Capítulo VIII:

Costes y beneficios de las Biotecnologías aplicadas a la salud humana

Autores:

Jordi M^a. Gol Freixa

- Licenciado en Medicina. Postgraduado en el Departamento de Epidemiología y Salud Pública de Yale University. Director de Programas de la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias (AETS), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo.

José Luis de Sancho Martín

- Médico Especialista en Nefrología y MBA por IESE. Director de la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias (AETS), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo.



Costes y beneficios de las biotecnologías aplicadas a la salud humana

○ La era de la genómica sólo acaba de comenzar

A efectos de tener un poco de perspectiva puede ser conveniente apuntar algunas fechas. El 14 de abril de 2003 se anunció, por parte del **"International Genome Project (IGP)"** (1) que se había alcanzado el último de sus objetivos, que era la secuenciación completa del genoma humano. Coincidió, con sólo 11 días de diferencia, con el 50º aniversario de la propuesta de modelo de doble hélice del DNA por parte de Watson y Crick. Se ha tardado pues 50 años en pasar del primer entendimiento consistente de la biología molecular del gen a su secuenciación completa. Por supuesto, el conocimiento de la existencia de muchas enfermedades hereditarias, su tipificación o su manejo clínico es bien anterior a ello. Ha sorprendido, a algunos tal vez relativamente, la celeridad con que el IGP se ha desarrollado, alcanzando sus objetivos antes de lo previsto. Ciertamente hay una sensación de perplejidad, de estar ante una nueva era, en la que hemos entrado más deprisa de lo previsto. Los médicos españoles de formación moderna, es decir casi todos, son conscientes del alcance que tendrá eventualmente esta era. Tanto la propia existencia de este proyecto internacional, liderado por los EEUU, el IGH, como la propia velocidad de su desarrollo tienen que ver con las relaciones entre la medicina, la ciencia y la tecnología, que son fascinantes, y con un esquema de trabajo bien planteado, financiado y ejecutado. Tras él hay los esfuerzos sostenidos en el tiempo de investigación básica, pero también hallazgos más o menos fortuitos e impredecibles, entre los cuales recordamos el de la transcriptasa inversa que permitió que tal objetivo fuera concebible como tal, no como fantasía, y la existencia por aquel entonces de una organización, la Office for Technology Assessment (OTA) del Congreso de los EEUU que tuvo la capacidad tanto de darle forma operativa como de hacer de lugar de encuentro entre la ciencia, la tecnología y la política(2). Todas las tecnologías comentadas en este libro, de una forma u otra están vinculadas a este proyecto, bien por contribuir a su desarrollo o ser derivados del mismo.

La genómica, pues, de alguna manera será un "sueño" hecho realidad, el sueño de todos los que han tenido conocimiento de la biología molecular en estos últimos 50 años. Para ello tenemos ya elementos absolutamente claves, como son el primer mapa genético, y todas estas técnicas en continuo desarrollo. Para que su potencial se desarrolle hace falta un esfuerzo muy considerable de investigación, tanto básica como aplicada, lo que demanda de medios y tiempos. Tal vez casi toda la investigación es y será sistemática e incremental pero no cabe descartar la aparición de innovaciones o descubrimientos fortuitos, y en esto la historia nos muestra sus lecciones, que contribuyen en el sentido de acelerar los cambios. Y, ciertamente que se presentarán dificultades reales, incluidos fallos y *fiascos* en su aplicación práctica. Muchos consideran que la biología entra en su edad de oro, desplazando a la física del pedestal de las ciencias experimentales.

○ Alcance del impacto sanitario de la genómica

Con el saber actual podemos anticipar y discutir con alguna garantía dos extremos. Por una parte cual es el esfuerzo necesario que habrá que hacerse a largo plazo para que el cambio de paradigma en las ciencias básicas se traduzca completamente en beneficios médicos para toda la población, partiendo de los referentes actuales. Por otra parte podemos anticipar el escenario a corto plazo. Cualquier consideración más allá de los próximos 24-36 meses, como mucho, es altamente especulativa; suele ser este el caso de toda prospectiva a medio plazo, incluso en sectores menos dinámicos. Hay aspectos obvios, que en el momento de escribir estas líneas están en los titulares de los medios de comunicación, como son las aplicaciones forenses y, en general, de medicina legal, para la identificación robusta individualizada de muestras biológicas. Para la medicina clínica y para la salud pública se postulan, en especial, las siguientes aplicaciones: el "screening" poblacional, la terapia génica, y la farmacogenómica. Todas preceden en su concepto al propio IGP y todas se han visto potenciadas por el mismo.

Diagnostico genético. Común a todas las aplicaciones es el diagnostico genético, discutido en otras partes de este libro (3) Ejemplos de los mismos se pueden ver en la fig. 1 (4).

La demanda potencial de test genéticos tiene actualmente a muchas empresas tratando de descubrir y patentar información sobre marcadores genéticos relacionados con

CONDICIÓN	GENES	USOS CONOCIDOS DE LA PRUEBA
NEUROLÓGICA		
Ataxia espinocerebelar	SCA1, SCA2, SCA3 SCA6, SCA10, DRPLA	Diagnóstico, predictivo
Alzheimer familiar de presentación precoz	PSEN1, PSEN2	Diagnóstico, predictivo
Enfermedad de Canavan	ASPA	Diagnóstico, prenatal
TEJIDO CONJUNTIVO		
Síndrome de Ehlers-Danlos de tipo vascular	COL3A1	Diagnóstico, prenatal
ONCOLÓGICO		
Poliposis adenomatosa familiar	APC	Diagnóstico, predictivo
HEMATOLÓGICO		
Talasemia beta	β -globina (HbB)	Detección de portador, diagnóstico prenatal

Figura 1. Ejemplos de Tests moleculares genéticos.

distintas enfermedades comunes o de base hereditaria, y las autoridades sanitarias están considerando el potencial impacto (favorable o desfavorable) de los nuevos test predictivos sobre los costes, calidad y equidad de los sistemas de salud (5).

El impacto de los costes finales de estos test va a depender de cómo su disponibilidad varíe el comportamiento de la asistencia sanitaria a corto y medio plazo. Los test genéticos son habitualmente muy costosos, por lo que su precio unitario impactará sobre el coste de los screening en la medida que varíe dicho precio por caso estudiado, el número de casos incluidos en los screening o ambos. No obstante, aunque el coste unitario en un screening fuese inferior al coste en su abordaje convencional, el coste total de un programa de screening podría elevarse si los test genéticos se aplican más ampliamente.

Deberá ponerse especial atención en los riesgos y beneficios relativos de intervenciones sobre pacientes que son testados versus los que no lo son, y en los pacientes con resultados positivos de los test respecto de los negativos. Dos determinantes fundamentales del balance final de estas consideraciones de coste serán el "timing" de los costes respectivos, y el grado en que los test son apropiadamente destinados a las poblaciones candidatas.

El impacto en los sistemas sanitarios variará considerablemente según los tests diagnósticos empleados, y particularmente cuando estemos considerando enfermedades comunes y multifactoriales como las enfermedades cardiovasculares o el cáncer, dada su alta prevalencia en nuestro entorno. Los tests genéticos en enfermedades hereditarias como el corea de Huntington no generarán sin embargo un gran impacto por tratarse de enfermedades raras, que limitan sus estudios a las familias de los pacientes. La Figura 2, sitúa las dimensiones del impacto de los tests genéticos en los sistemas sanitarios.

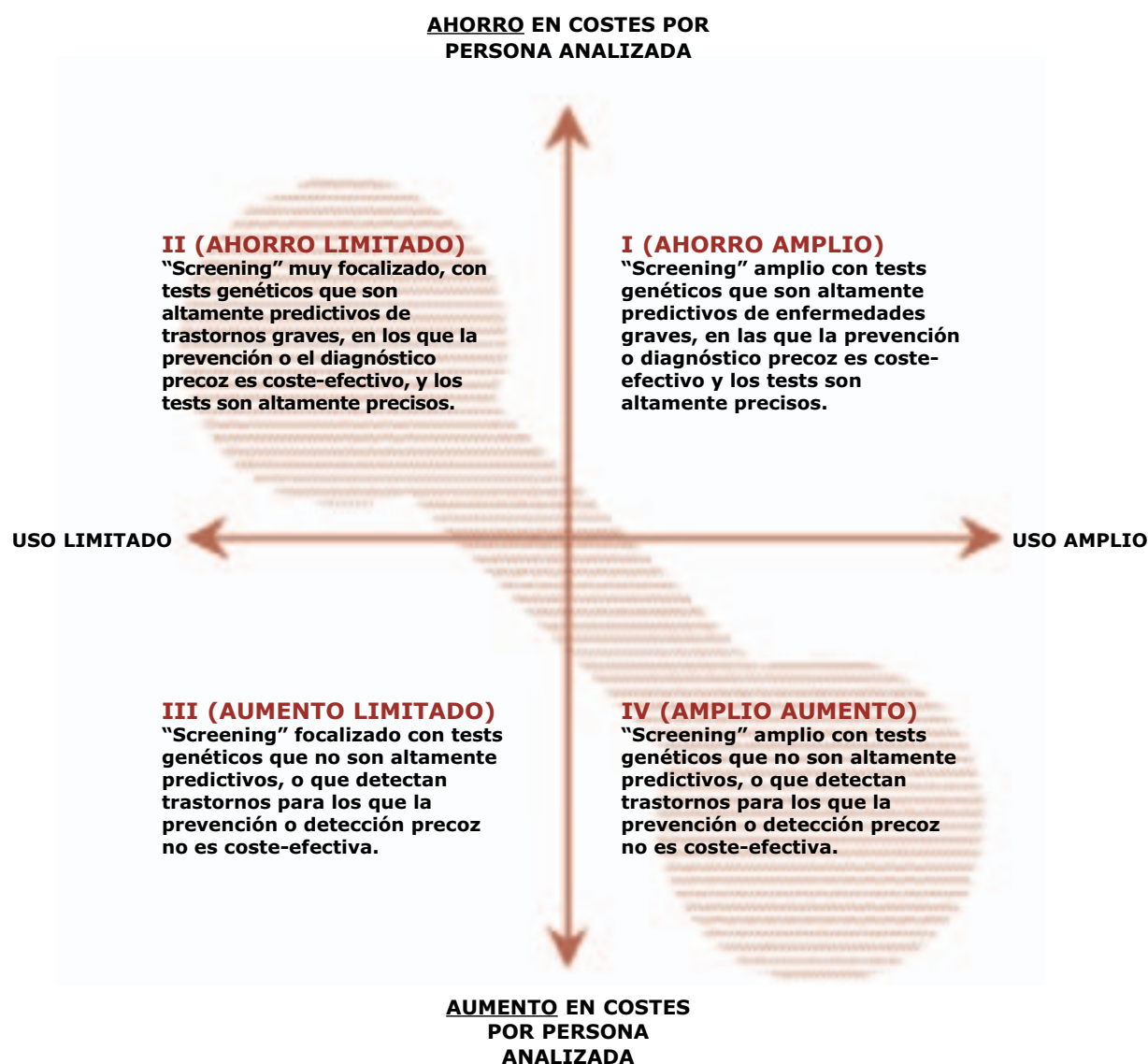


Figura 2. Impacto de los costes de los Tests genéticos sobre los sistemas sanitarios (La mayoría de los tests genéticos actualmente disponibles estarían dentro de las áreas sombreadas)

Las autoridades político-sanitarias deberán centrar su atención en aquellos test que tengan el mayor impacto para el sistema de salud, asegurándose de la población diana a quién van destinados, lo que es al menos tan importante, como la seguridad técnica de los tests en su influencia de impacto en el sistema sanitario.

○ Adopción de la genómica: 1) El caso de la medicina basada en la evidencia (MBE)

Aunque la definición, y la delimitación del alcance de la MBE es materia debatida (6), recordemos que precisamente la MBE surge, en su propio origen, a partir del hecho demostrado de que no se puede hacer una extrapolación directa sin mas consideraciones de las ciencias básicas a la práctica clínica sin pasar por la investigación clínica propiamente dicha, y ésta, abordada con pragmatismo, orientada al establecimiento robusto de la validez. El paradigma de referencia, cuando pueda aplicarse, es el ensayo clínico. Una revisión relativamente reciente (7) de los estándares metodológicos aplicados a la investigación clínica en genómica ha mostrado que en ella se reproducen los mismos problemas de concepto y/o de rigor metodológico para su validez clínica, es decir: de clasificación, de diseño, y, en general de robustez para inferencia poblacional. Se constata cierto paralelismo con la historia de la investigación farmacológica y terapéutica.

Parte del reto es inherente a la propia naturaleza interdisciplinar de la investigación en todas sus fases, y por tanto no sólo es cuestión de lenguaje o dominio conceptual sino también de liderazgo, de iniciativa y de ejecución. En otras palabras, el conocimiento más profundo de la causalidad de la enfermedad que aportan la genómica y la proteómica se combinan, revisándolo, el saber establecido. Esto plantea diversos problemas prácticos, incluido el gobierno o liderazgo de los proyectos.

El otro aspecto a destacar de forma especial es el de la medición de resultados de la asistencia clínica, comúnmente conocido en su expresión inglesa como "outcomes research" (OR), donde la investigación en cáncer es un caso especial, en el que comúnmente se encuentran problemas muy serios de integración entre la propia investigación clínica y la investigación de resultados (OR). OR incluye la investigación en la calidad de vida de los pacientes, y los componentes de la misma, al igual que la investigación en efectividad medida en términos tanto biológicos como de experiencia vital; frecuentemente la investigación clínica se queda en medición de variables de procesos, por la propia naturaleza de las variables, o, en su caso en "surrogate end points". Este es un problema descrito en la investigación de nuevos fármacos (8), donde los "end points" pueden ser la disminución del tamaño de un tumor, y que tiene su importancia regulatoria (ver más abajo), y con toda seguridad se hará más compleja conforme se vayan conociendo mejor los mecanismos moleculares de regulación de ciclo celular, y por tanto sea cada vez más factible la intervención activa y selectiva en su actividad.

○ Adopción sanitaria de la genómica. (2) Aspectos regulatorios

La dinámica de la propia innovación que en muchos casos significa la presentación de nuevos marcadores directamente aplicables a la clínica requiere precisamente de investigación hecha con pacientes tanto para validar aspectos técnicos como para probar su efectividad. Esto en una dinámica fluida donde las innovaciones aparecen, con toda su potencialidad a priori sin que los comparadores, que frecuentemente estarán en evaluación, hayan podido ser satisfactoriamente establecidos. Tal como se ha apuntado en el párrafo anterior, los parámetros de seguridad, eficacia, eficiencia, resultados, etc., de uso actual siguen siendo perfectamente aplicables. Parte del asunto es el desarrollo de la validación conceptual, y el reto en sí es el desarrollo y articulación de métodos, planteamientos o "esquemas" que permitan realizar investigación clínica en condiciones reales sin forzar la adopción generalizada de la innovación en cuanto a tal. Este es un reto importante para la dirección de los servicios de salud, ya que será a buen seguro percibido como cierto racionamiento. En especial cuando las circunstancias de la enfermedad sean especialmente dramáticas (como en el cáncer avanzado). Aun así todos los sistemas de salud desarrollados han articulado mecanismos para el abordaje de las cuestiones de adopción de innovaciones ante la incertidumbre de sus beneficios y/o de retos organizativos. En algunos sitios se denominan experiencias piloto, o de adopción limitada. En el sistema nacional de salud de España se ha ido desarrollando el procedimiento conocido como "uso tutelado", diseñado especialmente para adquirir experiencia en condiciones de uso real (no experimentales) ante innovaciones que teniendo probado su potencial beneficio no había suficiente volumen de experiencia para su adopción generalizada (9, 10).



Asimismo los esquemas conceptuales de las ciencias sociales, en particular de la economía de la salud son perfectamente vigentes y apropiados para la evaluación de las innovaciones que la genómica va aportando (11). Es decir, que cada innovación deberá ser examinada en mérito propio mediante no sólo el análisis "coste-consecuencia" al uso (habitualmente coste-efectividad, o coste-utilidad), sino que los patrones de medida de los beneficios, y ciertamente de los costes, no implican, según los propios economistas, especiales dificultades sobreañadidas.

○ Salud pública, genómica y bases del conocimiento genético poblacional

A corto plazo el problema principal es lo que algún autor ha llamado la "genómica de la enfermedad común" (6, 12), donde si se combina el cáncer, la enfermedad cardiovascular junto con hipertensión y diabetes tanto los estudios de asociación como los "scans genéticos" han mostrado correlaciones débiles y/o inconsistentes...

Hay una ingente labor por delante de marcaje poblacional sistemático y de refinar permanentemente el modelado del perfil genómico junto con exposición de factores de riesgo y modos de enfermar, patología y resultados ("outcomes"). Es cabal esperar que esta tarea en algunos aspectos pueda durar una generación o más.

De los métodos e instrumentos tenemos las bases: la epidemiología y la informática. Hay una experiencia del modelado de enfermedad, construcción y seguimiento de cohortes (poblaciones bien definidas) que ha permitido modelar, por ejemplo, los riesgos cardiovasculares (13), siendo su método conocido.

Este tema no puede plantearse en términos coste-beneficio ya que en la medida que se realice el "cambio de paradigma" es precisamente parte del mismo, es decir, es un elemento estructural, y como tal tanto los sistemas sanitarios como la autoridad pública (sanitaria o de ciencia y tecnología) lo contemplan.

○ Oportunidades y retos para los centros sanitarios, a corto y medio plazo

Aunque es un riesgo realizar extrapolaciones lineales de la experiencia histórica, la genómica puede resultar una línea de investigación superpuesta a las existentes para las unidades clínicas, especialmente si tienen alguna tradición en investigación clínica aplicada. Y de la misma manera que los centros donde la investigación clínica tiene cierta entidad tienen epidemiólogos de apoyo a la investigación clínica, cabe contemplar la conveniencia de incorporar consultores tanto en genómica como en biología molecular en un entorno muy cercano a la investigación clínica.

Reto adicional es la "interfase" entre los centros asistenciales y la industria, que inherentemente tiene modos de funcionamiento distintos de la farmacéutica, tanto en su dimensionado como en sus plazos. En España no se encuentran preparadas para ello, ni los centros, ni la industria, aunque ésta tiene lógicamente bastante más flexibilidad y capacidad de reacción. Parte del problema es organizativo, jurídico, e incluso de "cultura de empresa", donde hay mucho que avanzar más allá de la creación de instrumentos organizativos "ad hoc" como pueden haber sido las actuales fundaciones hospitalarias para el apoyo a las iniciativas de investigación. Asimismo falta personal especializado con saberes que no abundan, como los gestores de proyectos; personal superior, pero también medio y administrativo. Este problema no es sólo del sector sanitario sino del conjunto del país y se da asimismo en los laboratorios productores de conocimiento de las ciencias básicas, la mayoría ubicados en la universidad pública u organismos similares.

¿Cabe pensar en el registro genético sistemático de los pacientes asistidos? De hecho ya se hace mediante la conservación de especímenes, aunque a escala modesta, "artesanal". Evidentemente tendrá implicaciones para el archivo, la base de datos de admisiones, la gestión de confidencialidad por una parte y de integridad de la información por otra, con su logística correspondiente. Aún así, hay experiencias incipientes, que servirían –o servirán– de punto de partida. A medio plazo cabe pensar que se "irá por ahí", y por varios motivos. El primero es que será posible por el propio desarrollo de la informática. El segundo es que es deseable desde el punto de vista de la gestión de los servicios de

salud. Y el tercero, es que es deseable desde la perspectiva de la salud pública. Podríamos argumentar, en términos negativos, un cuarto: es inevitable que esto se produzca, aunque no existiera el reto de la genómica-proteómica, por el desarrollo tecnológico por una parte y por el desarrollo del sector sanitario por la otra. Este sector, desde hace ya bastante tiempo, se considera como paradigma de lo que se ha venido en llamar como “industria del conocimiento”, y en este sentido es un paso lógico. El desarrollo de la genómica puede añadir algo de premura o de urgencia a esta propia dinámica del sector. Desde otro ángulo, estas premuras que la genética añade resaltan la visibilidad que ciertos aspectos éticos y de gestión pudieran tener las iniciativas de desarrollo de sistemas de información, en sus dimensiones de integridad y robustez, de complejidad en el acceso, y ciertamente, de protección de la intimidad de los ciudadanos y profesionales.

Es fácil detectar estas tendencias, sobre todo dentro de un modelo de difusión y adopción de tecnologías que viene siendo validado desde hace bastante tiempo. De hecho hay algunos hospitales que ya están bastante avanzados en su digitalización, aunque son la excepción, estando en España el tema bastante menos desarrollado en atención primaria. Sucederá de forma generalizada, es cuestión de tiempo, y siempre algunos empiezan antes y otros son los rezagados. Otra cuestión, clave, es el papel de lo público frente a lo privado en todo ello, o la pregunta de cual es el papel del Estado frente al del mercado. Para que todo esto tenga lugar hacen falta estándares, y una cierta inversión en compatibilidad, que se aparta en general de las agendas de las firmas comerciales individuales. La experiencia mundial es consistente con esto, en todos los sectores. Sin entrar en las complejas cuestiones de liderazgo, cabe resaltar aquí que todavía hacen falta bastantes iniciativas de rango local o territorial, y ciertamente nacionales, para favorecer el desarrollo y existencia de sistemas de información adecuados para la investigación genética poblacional dirigida tanto a la investigación de mecanismos de acción como a la propia asistencia sanitaria. Por supuesto se requerirán medios económicos, y otros, de cierta entidad, pero sobre todo voluntad y visión para su diseño e implementación.



○ Globalización y cooperación internacional

Los fenómenos y los problemas apuntados hasta aquí no son únicos de España. El diagnóstico de los mismos, con muchos matices diferenciales, tampoco es único. La comunidad de la investigación clínica ya colabora a escala mundial, en sentido estricto, pero también en criterio amplio: se comparte el desarrollo de técnicas, los ensayos clínicos en buena parte son internacionales, y el conocimiento se ha globalizado. Tiene sentido asimismo compartir recursos, incluidos recursos económicos a escala internacional, ciertamente dentro del ámbito de la Unión Europea pero también trasatlántico. Un último aspecto de todo esto es considerar el conocimiento, el conocimiento genético, como fuente de riqueza y considerarlo como una inversión del presente cuyos rendimientos se realizarán a largo plazo. Esta es la visión en muchos países de Europa y en general de los países desarrollados. En España, este aspecto no está, tal vez, tan clara, en el sentido presupuestario, fiscal y organizativo; o mejor dicho, todavía no se acaba de concretar en presupuestación de niveles equivalentes, aunque ciertas decisiones políticas apuntan en esta dirección, como la creación de la Fundación Genoma España, o la del propio Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Cabe insistir en las dificultades del abordaje interdisciplinar y no subestimarlas. Tal como se ha indicado al comentar precisamente parte de los fracasos registrados hasta en la actualidad algunos autores en parte los imputan a las mismas, llegándose a proponer las dificultades de casar la cultura de investigación de resultados (“outcomes research”) con los planteamientos de la ciencias básicas o del entorno de laboratorio, cabe trasladar esta tensión a la escala de nivel organizativo: la gestión tiene una cultura, la investigación otra, y el desarrollo de productos o innovaciones una tercera. Cabe, pues, anticipar tensiones, por mucha sensibilidad que se pudiera tener “a priori” ante este tema.

○ Financiación: hacia la combinación óptima público-privada

Hay temas conceptuales que parecen enfocados pero todavía no completamente resueltos, como la "patentabilidad" de los genes (hasta la fecha está bastante claro que la respuesta es no, con pocas discrepancias), al igual que no se puede tener el copyright del conocimiento de la naturaleza, es decir, de las ciencias. Por otra parte si son patentables los dispositivos, los equipos, los procedimientos, y cualquier cosa "fabricable" industrialmente. Esto delimita bien qué parte de la investigación necesariamente deberá ser de dominio y financiación pública y qué parte podrá interesar a promotores privados, y ser financiada por ellos.

En principio toda la base de conocimiento individual-poblacional, especialmente los perfiles genéticos y su correlación con factores de riesgo, salud y enfermedad cabe pensar que será del ámbito público. La tarea para alcanzar esta base de conocimiento es todavía en gran parte es incipiente; apenas se puede apuntar todavía a la magnitud del esfuerzo que queda por hacer.

Biochips, bioarrays, sondas específicas inmunológicas o terapia génica podrán ser del interés de promotores. Es decir, productos más o menos "industrializables", donde la magnitud del valor que aportan a la clínica, o a la salud pública, es definible, y, en algún modo, cuantificable.

La OMS recientemente (14) ha recomendado que incluso los países en desarrollo, a poco que tengan un sistema sanitario con funcionamiento mínimo, que reserven un porcentaje de sus recursos sanitarios para la genómica, precisamente por su potencial sanitario, en todos los sentidos.

Estamos en un momento en el que hay a la vez un gran esfuerzo de investigación científica, y de desarrollo tecnológico, ambos en paralelo. Se combinan a la vez grandes expectativas, de base científica, junto con una considerable incertidumbre, o si se quiere, indefinición en los aspectos en que esto se concretará. Esto es relevante en el debate de la naturaleza de la financiación.

Conviene recordar que elementos significativos del proyecto genoma recabaron, inicialmente con éxito, acceso a financiación privada ("Celera Genomics" de Venter), y que hubo un considerable entusiasmo en ciertos sectores financieros por parte del "capital-riesgo" en invertir en biotecnología. Se sobreestimó la brevedad del plazo de "retornos" –beneficios– y la magnitud de los mismos, por supuesto. Hasta la crisis de 2001, donde, en jerga técnica, estalló la burbuja, con una depreciación media cercana al 35% al valor de la capitalización de las empresas del sector.

El sector ha sido bien estudiado desde la perspectiva del "business model"(15), en el sentido de la creación de valor y la organización de este valor entre los distintos sectores implicados. Hay un consenso considerable de que la mayor parte de la financiación a corto y medio plazo debe ser pública, mediante proyectos o programas interdisciplinarios e interinstitucionales, "*peer-reviewed*", distinguiendo entre los resultados de dominio público y los componentes patentables o propietarios. Se describe como una especie de círculo virtuoso donde la innovación tecnológica contribuye al avance del conocimiento científico, y éste a su vez al progreso tecnológico o de ciencia aplicada.

En la Figura 3, se resumen estos aspectos. En el eje vertical se presenta el espectro privado-público, tanto en financiación como en liderazgo e iniciativa, y en el eje horizontal el espectro de desarrollo tecnológico aplicado hasta la investigación pura. Este abordaje permite identificar cuatro escenarios arquetípicos singulares, con referentes históricos de desarrollo y difusión de la investigación.

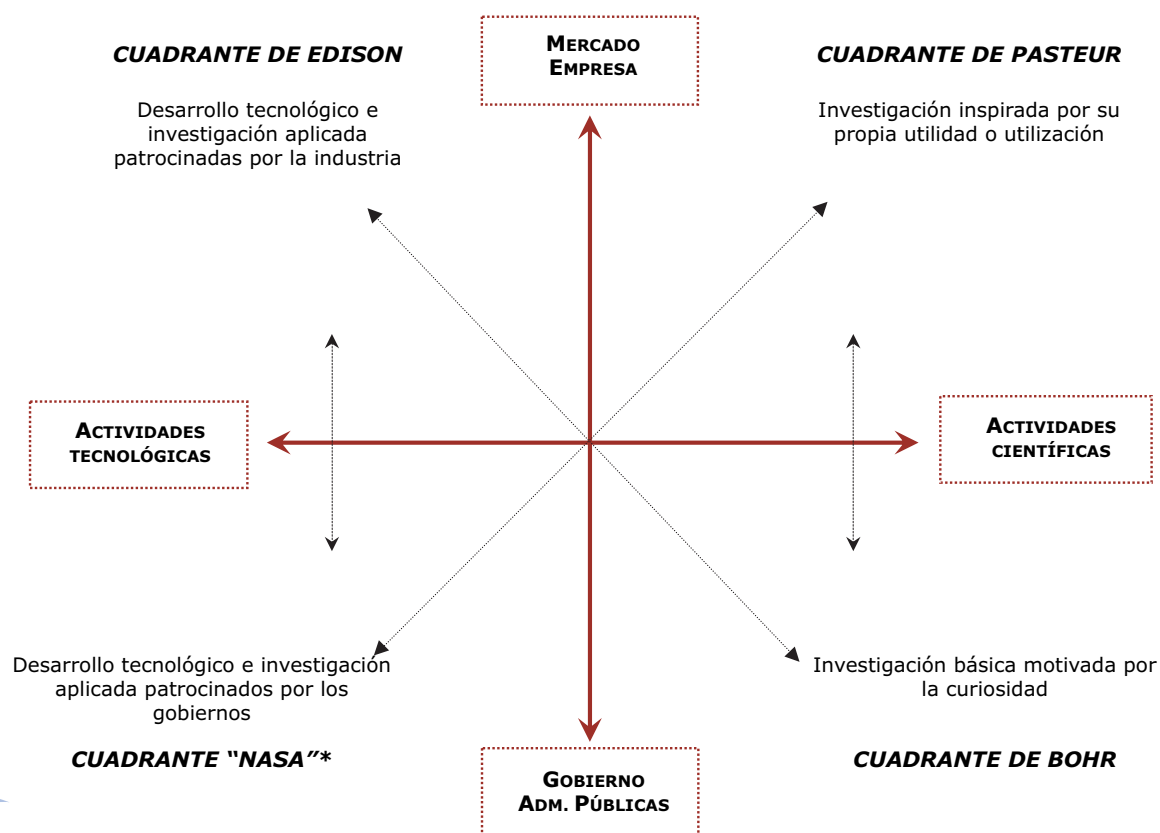


Figura 3. Esquema en dos ejes público frente a privado, e investigación frente a desarrollo.

Fuente ¹⁵ . Ruttan, V.W. 2001. Technology, Growth and Development: An Induced Innovation Perspectiva. New York and Oxford: Oxford University Press. Modificado por los autores.

El grado de desarrollo de estas tecnologías y su aplicabilidad es materia que preocupa a los entes financiadores y ciertamente a las autoridades responsables, quienes revisan el estado de la situación de forma dinámica y la actualizan. En el caso de España destaquemos al Observatorio de Prospectiva Tecnológica Industrial, del Ministerio de Ciencia y Tecnología, y a la Fundación Genoma España. Estos organismos han identificado una serie de tecnologías, clasificando a algunas de ellas como críticas, desde el punto de vista de su impacto estratégico para el desarrollo científico español.

En la Figura 4 las presentamos, clasificadas según se anticipa cual será la posibilidad media de acceso a las mismas por parte de la comunidad de I+D, según el último análisis disponible de prospectiva.

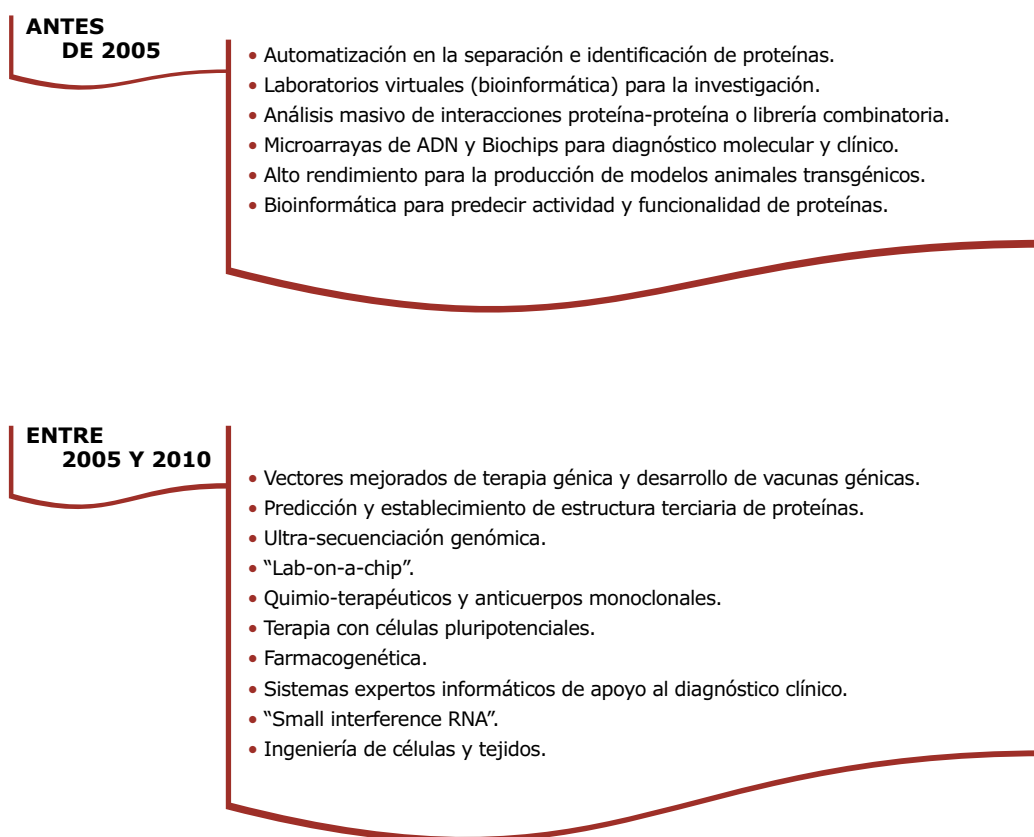


Figura 4. Tecnologías y fecha de materialización.

Fuente: Genoma España: Impacto de la Biotecnología en el sector sanitario, 1er informe de prospectiva tecnológica, 2003 Madrid, modificado.

○ Conclusiones

La genómica se está introduciendo en el día a día de la práctica de la asistencia médica desde hace tiempo. La actual visibilidad de la genómica, tanto en los medios de comunicación de masas como por los propios promotores puede producir un desencuentro entre ciertas expectativas y la realidad de su propio desarrollo, en especial, su aplicabilidad práctica. Esto nos conduce a identificar varios problemas distintos. Por una parte los de la adopción de la genómica como innovación, que en muchos casos no son inherentes a la misma sino a los procesos de innovación. Aquí ya hemos señalado que, una vez más, no se aprovechan del todo las experiencias existentes y se cometen errores evitables, mencionando el área regulatoria, la investigación clínica y la evaluación.

En segundo lugar las dificultades inherentes a la genómica y al estado de su desarrollo científico. Hay todavía una considerable incertidumbre en la velocidad de avance de los procesos de modelado de enfermedad, por ejemplo, y éste es uno más de los parámetros clave. Para el avance sólido hace falta un esfuerzo más interdisciplinario; ya se ha discutido la importancia de la epidemiología, y las servidumbres en "capacidad proceso" (bases de datos) de información que comporta. Inherente a la genómica y a su desarrollo está la dimensión bioética, e incluso filosófica, que inevitablemente ha estado, y estará presente en todos los planteamientos, lo cual hace todo ello todavía más dificultoso.

De la combinación de estos dos puntos cabe concluir que van a existir contratiempos y conflictos, entre los investigadores básicos y clínicos, entre ellos y los gestores, tanto de la asistencia como de la administración, y las autoridades regulatorias. Estos conflictos son minimizables, e incluso gestionables, si se enmarcan correctamente los riesgos y las incertidumbres, por un parte, y se es realista en la comunicación de expectativas por otra.

La genómica, su conocimiento, y su aplicación son ya parte de la realidad. Su avance eventualmente cambiará en profundidad nuestro entendimiento de la vida, la forma de practicar la medicina, y posiblemente muchos conceptos de salud pública. Como motor de cambio obligan también al desarrollo innovativo de su entorno. Esto está claro en el área regulatoria, en la de financiación de proyectos e incluso en los planteamientos de lo público frente a lo privado. Precisamente por ello se empieza a ver la magnitud de lo que queda por hacer en estas áreas.

AGRADECIMIENTOS

A los compañeros de la AETS y del Instituto de Salud Carlos III. A la Fundación Genoma España, y al Dr. Juan del Llano.



○ Bibliografía

1. <http://www.genome.gov/>
2. La OTA fue la primera institución formal para "evaluación de tecnologías" incluidas las sanitarias, y en ella se desarrollaron métodos, conceptos, y doctrina, adoptadas por muchas otras instituciones. Fue clausurada por motivos políticos en 1995, precisamente a raíz de los debates de la "guerra de las galaxias".
3. Indicar pag/cap del libro.
4. Elaboración propia a partir de: NEJM 347:1869-70.
5. Morgan, S.: Predictive genetic test and health system costs .Can Med Assoc .Jour 2003, 168, 8.
6. Haynes, R.: What kind of evidence is what Evidence-Based Medicine advocates want health care providers and consumers to pay attention to? BMC Health Services Research 2002.2:3 disponible via <http://www.biomedcentral.com/1472-6963/2/3>
7. Bogardus, S. T.; Concato, J.; Feinstein, A. R.: Clinical epidemiological quality in molecular genetic research: the need for methodologic standards. JAMA 1999;281:1919-1926.
8. Apolone, G.: Clinical and Outcome Research in Oncology. The need for integration. Health and Quality of Life Outcomes 2003, 1:3.
9. Petricoin, E. F.; *et al.*: Medical applications of microarray technologies: a regulatory science prespective Nature Genet.suppl 2002;32,474-79.
10. Hay diversas iniciativas de adopción selectiva de tecnologías mientras se genera volumen de experiencia, como son algunas "exemptions" del FDA, u otras iniciativas regulatorias o de evaluación de tecnologías. En España la experiencia se ha venido enfocando por la via del "uso tutelado", auspiciado por en Ministerio de Sanidad con la cooperación de distintas agencias de evaluación de tecnologías, nacional y autonómicas.
11. M. Drummond en: OCDE, Economic Aspects of Biotechnologies related to human health.
12. Cooper, R.: Genomics and Madicine: Distraction, Incremental Progress, or the Dawn of a New Age? Ann Intern Med 2003; 138:576-80.
13. Por ejemplo en el estudio de Framingham de el Public Health Service y los Nationals Institutes of Health de los EEUU.
14. Informe "Genomics and World Health", OMS Ginebra 2002. Version on line en: http://www3.who.int/whosis/genomics/pdf/genomics_report.pdf
15. Ruttan, V. W.: 2001. Technology, Growth and Development: An Induced Innovation Perspective. New York and Oxford: Oxford University Press.

Capítulo IX:

La transferencia de la Tecnología en España y sus problemas

Autores:

Enrique Castellón Leal

- Gerente de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Consejería de Sanidad y Consumo, Comunidad de Madrid.



La transferencia de Tecnología en España y sus problemas

Este capítulo trata, de alguna manera, sobre el proceso de transferencia de tecnología y conocimientos desde laboratorios y centros de investigación hasta la cabecera del enfermo. En un capítulo precedente de este mismo libro se habla de la transferencia, en sentido inverso, de los retos y las preguntas que, originándose en las salas de los hospitales, llegan a investigadores básicos y clínicos. Ambas direcciones son importantes, si bien, cuando el proceso se origina en el conocimiento y la tecnología, es preciso poner el acento en las dificultades que existen para que el desarrollo de la transferencia tecnológica sea eficaz en España y cuando se origine en la presentación de la enfermedad, en el papel del enfoque clínico para perfeccionar el uso de la tecnología y que esta sea efectiva y eficiente.

Entre las diferentes etapas del proceso de investigación biomédica, la investigación traslacional responde al proceso descrito más arriba. Que del conocimiento de las enfermedades en la esfera de la actividad clínica se deriven aportaciones que encaminen la investigación hacia respuestas más eficaces tiene mucho que ver con la proximidad intelectual y física de médicos asistenciales e investigadores básicos y clínicos y la convergencia de grupos y centros.

En la dirección opuesta, que la tecnología, en tanto que producción de nuevos conocimientos, desemboque rápidamente en aplicaciones a la cabecera del enfermo, implica apoyos firmes e inteligentemente dirigidos, producto de una política científica eficaz.

En relación con la trayectoria ascendente del bucle descrito, nuestro país ha avanzado con claridad hacia una mayor conectividad entre grupos e instituciones. La trayectoria descendente, sin embargo, no acaba de funcionar correctamente pero hay que confiar en que esta tendencia cambie en el futuro. El notable incremento en publicaciones e impacto de las mismas, la riqueza de conocimientos generada en una palabra, no se consolida en proyectos biotecnológicos destinados a ser empresas que permitan una rápida comercialización de aquellos avances. Sobre estas cuestiones se trata a continuación.

○ El escenario en que nos encontramos

Unos pocos datos seleccionados permiten alcanzar un diagnóstico bastante preciso de la situación de la investigación biomédica en general y de la transferencia de tecnologías en España.

Como ya es sobradamente conocido, en nuestro país se destinan pocos recursos a la I+D. En concreto, en 2001 el esfuerzo relativo alcanzó el 0,96% del PIB, que compara mal con el 1,93% de valor medio de la UE en el año 2000 (1).

A pesar de esto, no se puede pasar por alto que España ha llevado a cabo un esfuerzo considerable a lo largo de los últimos años. En euros corrientes, los gastos de I+D han crecido, entre 1988 y 2001, a una tasa anual del 10,4%, y el personal en I+D sobre población activa en un 6% anual (2). De hecho, como consecuencia de ese aumento, la producción científica ha crecido considerablemente, de 3.000 publicaciones (1980) a 9.000 (1988) y a 24.000 (2001), lo que en porcentaje sobre el total mundial de publicaciones supone pasar del 1% al 2,4%. Un informe reciente de Genoma España concluye que nuestro país es la cuarta potencia de la UE en investigación biotecnológica. Pero esta buena cosecha de literatura científica no trasciende a la actividad empresarial. Y así, por poner un ejemplo, menos del 40% del personal investigador participa en proyectos o convenios con empresas (3).

Siendo ya escasos, como hemos visto, los recursos destinados a investigación, el porcentaje de los mismos que es ejecutado por las empresas es sensiblemente bajo: 0,50% del PIB frente al 1,25% de media de la UE. La desproporción en el gasto interno de I+D ejecutado por el sector público como porcentaje del PIB no es, sin embargo, tan acusada: 0,43% versus 0,66%, según se desprende de los datos publicados por la OCDE en el año 2000. Estos datos son, además, coherentes con el relativamente escaso número de investigadores trabajando en empresas: 27,2% en España; 49,8% como media de la UE; 63,6% como media de la OCDE.

Estrechamente conectado con lo anterior, nos encontramos con que el porcentaje de patentes solicitado por nuestro país en el extranjero supone el 2,2% de la UE y el 0,6% de la OCDE. Dicho de otra manera, y de acuerdo con la Oficina Europea de Patentes, España solicitó 2,5 patentes por millón de habitantes, frente a una cifra de 17,9 de promedio en la UE (4).

Si la inversión de recursos públicos resulta insuficiente, la correspondiente a capital privado aún lo es más en términos comparativos, y muy especialmente en la primera fase de desarrollo de las empresas. En España, las empresas de capital-riesgo, dedican el equivalente al 0,02% del PIB a invertir en alta tecnología. Cinco veces más dedican en Suecia, Reino Unido, Bélgica y Holanda y tres veces más, en Alemania, Francia e Irlanda (5). De esa exigua cantidad, alrededor del 1% se destina a la etapa de "siembra" (seed capital), 10% a la etapa de "start-up" y 60% a la etapa de expansión (6).

La inversión pública tampoco es particularmente sensible para con las pequeñas e incipientes empresas. El Plan Nacional de I+D+i correspondiente a 2001 destina el 0,6% de sus recursos (subvenciones más anticipos) a PYMES y el 25,6% al resto de empresas (7).

Con la información anterior se puede dibujar un escenario bastante clarificador:

- Tanto los recursos públicos como los privados tienden a penalizar "de facto" los proyectos (las empresas) en sus etapas más incipientes. En el caso privado por considerarlos excesivamente arriesgados. En el caso público las causas pueden ser más complejas y se tratará más adelante, aunque también el riesgo se comporta como una variable determinante.
- Como consecuencia indirecta de lo anterior (y también por otras causas concurrentes) en España se produce un espectacular "gap" entre el progreso de la investigación científica y el desarrollo tecnológico, medido como obtención de patentes y otros mecanismos de transferencia de tecnología. Un dato ofrecido por el CSIC evidencia claramente esta disociación: de los investigadores del área de la biotecnología, un 40% ha sido citado en patentes americanas. Sin embargo, sólo el 2% de estos investigadores es titular de una patente en los EEUU (8). Las razones son múltiples:
 - No hay cultura patentadora y por ello el investigador no es consciente por lo general de las posibles aplicaciones de sus trabajos; los incentivos están dispuestos de tal forma que llevan a publicar lo más rápidamente posible, las patentes tienen unos costes en dinero, tiempo y papeleo administrativo que disuade a muchos investigadores, si es que llegan a hacerse una idea de que es exactamente lo que habría que hacer.
 - Finalmente, la ausencia de una "masa crítica" de "start-ups" debido a la escasez de apoyos, elimina una posible señal que indicaría a los investigadores el camino a seguir.

○ Las dificultades para captar recursos financieros privados

Diagnosticada la situación, merece la pena avanzar más en profundidad sobre las causas porque del conocimiento de las mismas podrán derivarse políticas, en principio, más adecuadas.

Las pequeñas empresas biotecnológicas tropiezan con importantes obstáculos a la hora de captar recursos financieros privados, en gran medida porque introducen una serie de elementos de incertidumbre con los que el sistema financiero no está acostumbrado a tratar: de entrada pretenden desarrollar productos para mercados que en el momento en que se presentan los planes de negocio son muchas veces inexistentes. En segundo lugar, no siempre es posible proteger de manera absoluta la tecnología de la empresa y, en cualquier caso, no es fácil saber qué competencia puede encontrarse a lo largo del camino, puesto que las fronteras de la investigación avanzan muy rápidamente. Tercero, los desarrollos se prolongan en el tiempo más allá de lo deseable. Esto se aplica muy especialmente al área de salud humana y mucho menos a otros territorios como el de la biotecnología vegetal o alimentaria. De hecho aquí los inversores privados se atreven



“más”. Cuarto, existen muchos elementos intangibles de difícil valoración, como el propio conocimiento y la experiencia de los componentes de la empresa (investigadores y gestores) y la investigación que está en la base de la compañía. Los potenciales inversores carecen de instrumentos para valorar esta suerte de activos que escapan de sus protocolos tradicionales, de manera que perciben a los incipientes proyectos biotecnológicos como negocios de muy alto riesgo.

Todo lo anterior es especialmente cierto en lo que se refiere al inversor institucional y en concreto a la entidad de crédito pero también lo es en gran medida para el capital-riesgo, no importa su aparente mayor flexibilidad. De hecho, de acuerdo con una encuesta llevada a cabo por encargo de la Asociación Europea de Capital-Riesgo, sobre 364 compañías en distinta fase de desarrollo, el 95% de las mismas consideraban este tipo de recurso como crítico para su creación, supervivencia o crecimiento y el motivo no era exclusivamente el recurso financiero. Había también captación de ideas innovadoras, seguimiento presupuestario, consejo financiero, acceso a otras empresas biotecnológicas con las que compartir experiencias etc. La parte negativa es que estas sinergias sólo alcanzan a una pequeña proporción de empresas y no precisamente las más incipientes, es decir, las más cercanas al investigador.

Las empresas de capital-riesgo (“venture capital”) se dedican sobre todo a las compañías biotecnológicas en etapas avanzadas, ya que son las únicas que pueden ofrecer oportunidades de salida en ausencia de alternativas bursátiles. Las compañías en etapas precoces de desarrollo lo tienen mucho más complicado. Aún cuando un inversor mostrara algún interés en su financiación, la valoración sería ínfima, por no hablar de la duración del periodo de tiempo necesario para cerrar el proyecto, que nunca será inferior al año.

Pero incluso aquellas que consiguen captar recursos se enfrentan al problema de la pérdida de independencia y control sobre su propia evolución. Esto no debería suponer un problema de no existir un choque natural entre la cultura de los emprendedores que proceden del mundo de la investigación y los analistas de los sectores financieros. Estas potenciales desavenencias no son inocuas: un estudio llevado a cabo por la Comisión Europea demuestra que las compañías que logran preservar su independencia son, al final, las que mayor éxito alcanzan (9).

La posibilidad de alcanzar el mercado de valores es otra opción para captar recursos que, sobre el papel, tienen estas empresas, aunque muy pocas están en condiciones de hacerlo. En la práctica, sólo acceden a esta oportunidad aquellas empresas en las que ya se ha involucrado el capital-riesgo, en gran medida porque la presencia de estas últimas compañías convierte a la firma biotecnológica en un producto más atractivo para los mercados.

Como última alternativa real, en el marco privado, queda la autofinanciación, que resulta por otro lado común en España. De esta manera, algunas empresas no biotecnológicas consolidadas desarrollan sus propias divisiones biotecnológicas a las que soportan financieramente. O bien, son los propios emprendedores, en el caso de las “start-ups” los que contribuyen con sus recursos personales. No es necesario señalar que es difícil generar innovación en estas circunstancias.

○ Las dificultades de obtener recursos públicos

Considerando el comportamiento inversor privado, no cabe duda que se está abriendo un “gap” importante entre la financiación -corta- de los proyectos avanzados y la financiación -nula- de las experiencias empresariales en etapas tempranas. Este es precisamente el espacio que tendrían que llenar las iniciativas gubernamentales.

A este respecto, hemos asistido en los últimos años a experiencias como la llevada a cabo en Alemania, de subsidiar “start-ups” y el resultado ha sido sin duda positivo, incluso considerando el hecho de que los criterios de financiación hayan podido ser generosos, ponderando más las ideas que el valor “ortodoxo” de los proyectos. Pero es precisamente este “plus” de heterodoxia el que cabe pedir a un Gobierno. De escrutar a fondo los planes de negocio ya se encargan los inversores privados y es probablemente un acierto de ese país que haya compañías que alcancen esa fase, aunque el precio pagado haya sido el apoyo a proyectos que a la postre no resultaron del todo consistentes.

En España y en lo que a recursos públicos se refiere, la Administración dedica a la transferencia de tecnologías recursos derivados de los propios Presupuestos Generales del Estado y otros que se encarga de canalizar y que proceden de organizaciones privadas. En cualquier caso, el volumen total de todos estos recursos dista de ser suficiente ya que sólo permite financiar alrededor del 8% del gasto en I+D de las empresas, que es algo menos que la cantidad con la que el sector empresarial contribuye a la I+D pública.

El papel que juegan las administraciones públicas al recaudar fondos privados con objeto de gestionarlos sólo tendría sentido si, primero, el volumen global de recursos aumentara, es decir, los fondos recaudados no estuvieran originalmente destinados a ser invertidos en investigación y desarrollo caso de que las administraciones no los captasen y, segundo, si esos recursos se destinasen a áreas –especialmente investigación básica sin consecuencias comerciales a corto plazo– a las que las empresas nunca los destinarían. Sería, en otras palabras, un incremento neto y una reorientación del uso de los recursos financieros privados, en base a intereses públicos. Particularmente beneficiosa está siendo la iniciativa, algo marginal de momento, de cofinanciar al 50% proyectos privados, por lo que supone de estímulo necesario a la reticente inversión privada en biotecnología.

Sin embargo, las dos consideraciones básicas anteriores no suelen cumplirse y, de hecho, las empresas que por algún motivo ofrecen recursos a la Administración pública para que esta los gestione, dejan de invertir estas cantidades en investigación, bien sea en la propia empresa, en otros centros de investigación públicos (sobre todo) o privados, o en otras empresas. Esta relación inversa se aprecia muy claramente en las series temporales de participación pública y privada en el gasto interno total en I+D a lo largo de la última década en España (3). En cualquier caso, no tiene mucho sentido que la Administración distraiga fondos privados, en definitiva, que reste en vez de sumar, ya que, como se ha dicho más arriba, existe un notable déficit de financiación privada.

Aparte de ello, es mucho más probable que los recursos que proceden de la Administración y son destinados a proyectos empresariales alcancen a empresas consolidadas en vez de a las de nueva creación. Es un hecho que los programas públicos no son fácilmente accesibles para las “start ups” por varias razones:

- Cuando son anticipos exigen unas garantías de rentabilidad que este tipo de empresas no se encuentra en condiciones de asegurar.
- Si se trata de subvenciones, la empresa habría de financiar su desarrollo de entrada, lo que no es posible ya que es precisamente la falta de recursos lo que impide que estas recién creadas compañías inicien su andadura. En la práctica, muchos proyectos ni siquiera acaban constituyéndose como empresas porque falta el apoyo para esta primera y crítica fase, que resulta esencial para la captación posterior de cualquier tipo de recurso.
- El proceso de aplicación es excesivamente prolongado. La espera para recibir los fondos, en el mejor de los casos, es aún mayor.

De alguna manera, el sector público maneja los mismos tipos de criterios que el sector privado a la hora de financiar proyectos, en vez de actuar de una manera más flexible y atrevida para impulsar esta categoría de empresas en España. Existen investigadores muy solventes y de gran peso específico, así como acreditados gestores, cuya presencia en un proyecto debería ser garantía suficiente para la Administración pública aunque pueda no serlo para la inversión privada. Sin embargo, no siempre la captación de recursos privados se encuentra tan plagada de dificultades. Existe la figura privada del “business angel”, individuos con experiencia empresarial y recursos abundantes que son capaces de ver más allá de los números de los planes de negocio y valorar las ideas y las personas. ¿Qué impide que la Administración asuma un papel semejante con sus propios investigadores y gestores, sobre cuya calificación tiene perfecta información?



○ Dificultades para el conocimiento y los recursos humanos especializados

Pero no sólo tienen estas empresas dificultades en el acceso a los recursos financieros. También a personal cualificado y al conocimiento. Todo ello, que analizo a continuación, limita sus potencialidades.

Un estudio de PricewaterhouseCoopers en 1999 sobre pequeñas y medianas empresas biotecnológicas concluyó con que el 80% de las mismas tenían problemas para encontrar y retener personal cualificado. No es sorprendente. Las actividades de innovación implican nuevos procesos y nuevos productos y el entrenamiento requerido para alcanzar una alta calificación en este campo lleva tiempo. De manera que esta escasez de oferta trae consigo costes elevados para atraer profesionales de alto nivel, condición, por otro lado esencial, para que los inversores privados vean el proyecto con un mínimo de confianza.

Un acceso estable a diferentes vías de conocimiento también constituye un problema para las pequeñas empresas biotecnológicas. Como las invenciones no son hallazgos aislados, el éxito de cualquier proyecto guarda estrecha relación con las múltiples fuentes de conocimiento directa o indirectamente relacionadas y en una relación fluida en las dos direcciones, de la empresa hacia la universidad o institución científica y en sentido contrario. Se puede constatar que la relación entre PYMES biotecnológicas e instituciones públicas de investigación y universidades es muy pequeña en España y en Europa. Según un estudio de la Comisión sólo el 10% de las compañías innovadoras mantenían acuerdos de cooperación en 1996. Otro dato significativo es el reducido número de "spin-offs" creadas en la UE, tres veces por debajo de los EEUU (10).

Esta circunstancia es debida a varias razones: el escaso conocimiento de lo que se hace en universidades y centros públicos de investigación, complicado por la compleja estructura de esas instalaciones y la multiplicidad de líneas de trabajo; los diferentes objetivos en relación con los resultados buscados y la diferente cultura organizativa. A esto hay que añadir el coste que para la empresa entraña esta relación que, de nuevo, se hace difícil de asumir para las compañías más incipientes.

○ Los viveros de empresas

Este problema (y otros) puede ser en principio solucionado por la creación –estimulada públicamente– de viveros de empresas. Aquí, el acceso al conocimiento desde instituciones académicas o de otras empresas se hace físicamente más fácil, y está demostrado que las relaciones personales son un requisito esencial para un intercambio eficiente de conocimientos. En 2001, el Proyecto Best de la Comisión Europea (11), identificó 842 viveros en el territorio de la UE, desigualmente distribuidos. Por ejemplo, Finlandia tenía entonces 12 viveros de empresas por cada millón de personas ocupadas y en ese orden se encontraban también el Reino Unido, Suecia y Alemania. En España la cifra es de 2,6 viveros por millón de personas ocupadas.

A la vista de los datos anteriores y como conclusión se puede decir que en España, de momento, aparecen pocas empresas biotecnológicas, especialmente en el campo de la salud humana, y las que aparecen tienen dificultades en prosperar. En otras palabras, la investigación transnacional es quizá el punto más débil de la I+D española. Sin embargo, las cosas pueden empezar a cambiar a tenor de algunas evidencias que empiezan a aparecer en la actitud y en las iniciativas de las administraciones públicas.

Son cada vez más frecuentes los encuentros, organizados por el sector público, entre investigadores emprendedores y potenciales financiadores. Hay por tanto un mejor conocimiento en los dos sentidos, que es algo básico. Distintas comunidades autónomas han constituido Centros Europeos de Empresas e Innovación, empresas públicas con la participación de diversas instituciones públicas y privadas (como colegios profesionales) y el patrocinio de la UE. Estos centros tienen como objeto la dinamización de los recursos locales y el estímulo a la creación y desarrollo de empresas innovadoras. La Comisión Europea los concibe, por su parte, como una red que permitirá el intercambio de información y experiencias, al tiempo que favorecerá la cooperación tecnológica, comercial y financiera (12).

Se empiezan a utilizar en algunos casos y se consolidan en otros, tanto por parte de la Administración del Estado, como por parte de las administraciones autonómicas, instrumentos del tipo del capital-riesgo o los préstamos participativos, tradicionales en el ámbito de la industria más convencional, pero novedosos en el ámbito de la biotecnología. La presencia de estos recursos es a su vez un estímulo para la incorporación de la iniciativa privada. De momento el éxito acompaña más a las iniciativas en tecnología vegetal y alimentaria, cuyos retornos presumiblemente se producirán a corto-medio plazo, que a las biomédicas, pero no deja de ser esperanzador. En conjunto, todas estas iniciativas son positivas y permiten confiar en que nuestro país progrese en la creación de una base biotecnológica más sólida y menos dependiente.



○ Bibliografía

1. *Indicadores de Ciencia y Tecnología 2002*. Publicación interna. Marzo 2003. Secretaría de Estado de política científica y tecnológica. Dirección General de Investigación. Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT).
2. *"Análisis comparativo de la producción científica de la Unión Europea, España y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas"*. Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 1999.
3. *"Estadística sobre las actividades en Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico (I+D)"*. INE 2003.
4. Informe COTEC, 2003.
5. Asociación Europea de Capital Riesgo (EVCA). Anuario 2002
6. *"Capital Riesgo y Private Equity en España"*. Informe ASCRI (Asociación Española de entidades Capital Riesgo) 2003.
7. *Memoria de actividades de I+D+i*. 2001. Comisión interministerial de Ciencia y Tecnología. MCYT.
8. Plaza, L. M.; Albert, A.: *"La ciencia básica al servicio del desarrollo tecnológico"* Centro de Información y Documentación Científica (CINDOC) CSIC, 2002.
9. *Benchmarking of Business Incubators*. Centre for Strategy & Evaluation Services. European Commission.
10. Allansdottir, A.; et al.: *"Innovation and Competitiveness in European Biotechnology"*. Enterprise paper Nº 7. Enterprise Directorate General. European Commission, 2002.
11. *"Proyecto Best sobre viveros de empresas"*. Comisión Europea 2001
12. *"Ciencias de la vida y Biotecnología: Una estrategia para Europa. Informe de situación y orientaciones futuras"*. Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo y al Comité Económico y Social Europeo. Comisión de las Comunidades Europeas. Bruselas 5.3.2003.



ESTEVE



**Generalitat
de Catalunya**

