

De la Doble Hélice a la Farmacogenómica

AN Dr. Benjamín Paz Aliaga

RESUMEN

Se hace un inventario a los grandes avances en la biología molecular del gen desde que Watson y Crick descubrieran la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN) hasta los recientes logros en la farmacogenómica luego del desarrollo del Proyecto Genoma Humano. Se pone énfasis en la manera cómo éstos descubrimientos han posibilitado el gran avance de la ciencia médica al entender mejor las alteraciones moleculares de las enfermedades, posibilitar el desarrollo de ventajosos métodos de diagnóstico y tratamiento e incluso de prevención de las enfermedades.

No cabe duda que la herencia comenzó a llamar la atención del hombre desde que éste aparece sobre la Tierra, sin embargo, sólo en la sexta década del siglo IX se comienza a estudiarla con verdadero rigor científico. En efecto es Gregorio Mendel quien realiza ingeniosos cruzamientos de plantas (guisantes) y consigue deducir las denominadas Leyes de la Herencia, según las cuales se podía predecir las características de los descendientes en base a las características de los progenitores. A partir de 1866 en que se publican las leyes de Mendel, se sucedieron grandes descubrimientos en torno a la localización y estructura de las unidades de la herencia (llamadas tempranamente genes) hasta el singular aporte de Watson y Crick quienes encontraron que el ADN, el constituyente químico del gen, estaba formado de dos cadenas de polinucleótidas que formaban una doble hélice, marcando el nacimiento de la Biología Molecular que hasta nuestros días asombra a la ciencia médica y en general a la humanidad con sus inagotables avances .

Todos estos años de vida que tiene la Biología Molecular los podemos descomponer en las siguientes etapas:

- Período previo a la doble hélice (de 1866 a 1953)
- Período del estudio del funcionamiento del gen (1953 a 1972)
- Período de la manipulación genética (1972-2004)
- Período postgenómico (2004 -----)

PERIODO PREVIO A LA DOBLE HÉLICE

Casi en la misma época en que Mendel publicaba las Leyes de la Herencia, Miescher identificó un nuevo componente químico de la célula, el ácido desoxirribonucleico, que más tarde correspondería al constituyente químico del gen. El siglo XX comienza con el trabajo de Morgan quien utilizando la mosca *Drosophila* determina que el local celular de los genes estaba en los cromosomas. Poco tiempo después el médico londinense Archibald Garrod al estudiar las bases moleculares de una enfermedad genética, la alcaptonuria, atrevidamente propuso que la función del gen era la síntesis de las enzimas. Más tarde esta idea se confirmó y amplió en el sentido que la función del gen era no solamente la síntesis de las enzimas sino de todas las demás proteínas.

Entre tanto, la demostración que el ADN era el constituyente químico del gen tardó varias décadas. En 1944 Avery, MacLeod y Mc Carty dan el primer indicio experimental sobre el rol del ADN en la transmisión genética y finalmente a inicios de la década del 50 Alfred Chase y Martha Chase usando el bacteriófago T2 marcado

radioactivamente permitieron concluir que los genes eran químicamente ADN.

En este contexto, la dilucidación de la estructura del ADN cobró gran interés; el propio Linus Pauling asumió el reto pero sin obtener el resultado esperado. La historia tenía reservado este mérito al biólogo estadounidense James Watson y al biofísico británico Francis Crick quienes basados en los análisis cristalográficos de la inmerecidamente olvidada Rosalind Franklin dilucidaron la estructura de la molécula más importante para la vida, el ácido desoxirribonucleico (Figura 1). El 25 de abril de 1953 se publicaba en la revista Nature la estructura en doble hélice del ADN(1). Esta publicación es considerada por muchos como la contribución científica más importante hecha por el hombre hasta hoy. Por esta hazaña científica Watson y Crick, junto a Maurice Wilkins recibieron el Premio Nobel en Medicina y Fisiología en 1962.

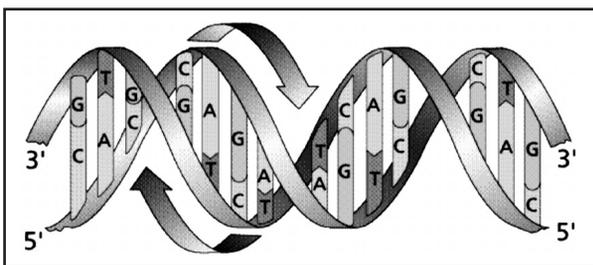


Figura 1.- La doble hélice de Watson y Crick

PERIODO DEL ESTUDIO DEL FUNCIONAMIENTO DEL GEN

En el mismo manuscrito de Watson y Crick se proponía la manera como el ADN se podía duplicar antes de la división celular, para que cada una de las dos células hijas tuvieran la misma información que la célula padre. Las dos hebras se separaban y cada una de ellas servía de molde para la síntesis de la cadena nueva. Este modelo se denominó como semiconservativo y fue probado posteriormente gracias al ingenioso experimento de Meselson y Stahl. El proceso de duplicación de la molécula de ADN recibió la denominación de replicación.

El médico Arthur Kornberg de la Universidad de Stanford fue uno de los primeros en pensar que

el proceso de la replicación era realizado por una enzima y se lanzó en su búsqueda anunciando al mundo en 1958 el descubrimiento de la enzima de la replicación(2), la ADN polimerasa. Kornberg compartió con el también médico Severo Ochoa el premio Nobel en 1959.

Si bien Paul Zamecnick había demostrado varios años antes que a nivel de los ribosomas ocurría la síntesis proteica, no se entendía como el ADN (genes) localizado en el núcleo podía dirigir la síntesis proteica fuera del núcleo, esto llevó al descubrimiento del ARN mensajero, una molécula del otro ácido nucleico, que formado en el núcleo tomando como molde el ADN del gen salía de allí y viajaba hasta los ribosomas llevando la información. El propio Zamecnick junto a Mahlon Hoagland descubrieron el ARN de transporte que se encargaba de llevar los aminoácidos y participar en la síntesis proteica.

Estos avances permitieron que a mediados de los 60' se supiera el mecanismo a través del cual los genes dirigían la síntesis proteica, siendo representado mediante un esquema que fue denominado como el Dogma Central de la Biología Molecular (Figura 2)

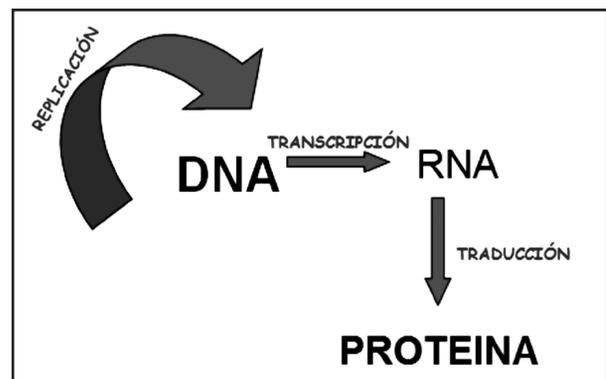


Figura 2.- El dogma central de la Biología Molecular

Según este esquema el ADN experimenta su autoduplicación antes de la división celular (replicación). La información contenida en el gen pasa al ARN mediante el proceso de la transcripción y finalmente según la secuencia de nucleótidos en el mensajero se van uniendo los aminoácidos en una secuencia específica para constituir la proteína, siendo denominado este proceso como la traducción.

Lo que aún no quedaba muy claro era cómo la secuencia de nucleótidos en el mensajero dictaba la secuencia de aminoácidos en la proteína, es decir, cuál era la correspondencia entre nucleótidos y aminoácidos. Como eran 20 los aminoácidos diferentes que formaban las proteínas y 4 los nucleótidos diferentes que se encontraban en el ARN mensajero se pudo deducir que serían 3 nucleótidos como mínimo los que codificarían para cada aminoácido. Este supuesto se pudo demostrar experimentalmente y allí vino otro gran reto para la Biología Molecular determinar a qué aminoácidos correspondían los 64 tripletes (codones) posibles que podían encontrarse en el ARN mensajero, esto fue denominado como la dilucidación del código genético.

El trabajo de los laboratorios dirigidos por Nirenberg y Ochoa con el apoyo invaluable de Khorana hicieron posible que el código genético quedara descifrado en 1965 (3)(Figura 3)

Ala (A)	GCU, GCC, GCA, GCG	Lys (K)	AAA, AAG
Arg (R)	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	Met (M)	AUG
Asn (N)	AAU, AAC	Phe (F)	UUU, UUC
Asp (D)	GAU, GAC	Pro (P)	CCU, CCC, CCA, CCG
Cys (C)	UGU, UGC	Sec (U)	UGA
Gln (Q)	CAA, CAG	Ser (S)	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Glu (E)	GAA, GAG	Thr (T)	ACU, ACC, ACA, ACG
Gly (G)	GGU, GGC, GGA, GGG	Trp (W)	UGG
His (H)	CAU, CAC	Tyr (Y)	UAU, UAC
Ile (I)	AUU, AUC, AUA	Val (V)	GUU, GUC, GUA, GUG
Leu (L)	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG		
Comienzo	AUG	Parada	UAG, UGA, UAA

Figura 3.- El Código Genético

PERIODO DE LA MANIPULACIÓN GENÉTICA

A inicios de la década de los 70' la Biología Molecular adquiría su mayoría de edad al entender el mecanismo del funcionamiento del gen y estaba preparada para iniciar la manipulación genética, comenzar a aislar los genes y amplificarlos para tener cantidades suficientes de cada gen y así poder estudiar sus mecanismo de regulación.

Se hacía necesario disponer de enzimas que cortaran al ADN en lugares específicos, para así poder trozar el ADN e ir individualizando los genes. Esto se consiguió con el descubrimiento de las denominadas enzimas de restricción, que están

normalmente presentes en las bacterias y cortan el ADN en secuencias específicas denominados palíndromos. El Premio Nobel de Medicina de 1978 fue concedido a los microbiólogos Arber, Nathans y Smith por haber identificado dichas enzimas.

Como había necesidad de sacar muchas copias del gen (amplificar o clonar) para poder estudiarlos, se pensó que los plásmidos podrían ser útiles. Estos pequeños círculos de ADN de doble hebra presentes en las bacterias y que se replicaban más rápidamente que el ADN genómico bacteriano, podían ser retirados de las bacterias, cortados con una enzima de restricción apropiada y una vez linearizado unirle el fragmento de ADN, volver a cerrar el plásmido y retornarlo a la bacteria. Esta estructura, denominada ADN recombinante (Figura 3) comenzaba a multiplicarse y con ello se obtenían un gran número de copias del gen de interés.

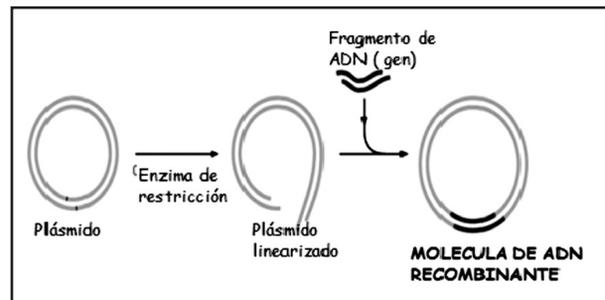


Figura 3.- Construcción de una molécula de ADN recombinante

Ya en el año 1972 se logró el descubrimiento de una enzima que permitía pegar fragmentos de ADN, la ADN ligasa y también por su uso en crear la primera molécula de ADN recombinante (4).

A mediados de los 70' se consigue construir una molécula de ADN recombinante que tenía el gen de la hormona de crecimiento humano como inserto y que al ser introducida en bacterias se conseguía la expresión del gen, es decir la síntesis en la bacteria de la hormona de crecimiento humano. Poco tiempo después se sintetiza por este mismo procedimiento la insulina humana (insulina recombinante) y esta hormona resulta la primera en ser comercializada. Con ello comenzaba a hacerse realidad la síntesis de proteínas humanas que por métodos químicos no era factible y con grandes aplicaciones en el tratamiento de diversas enfermedades.

Así aparecieron la eritropoyetina, los factores antihemofílicos, el activador del plasminógeno tisular, interferones, etc.

Con la tecnología del ADN recombinante se diseñan métodos para el diagnóstico de enfermedades genéticas incluso en el estado fetal, precisamente en 1981 se hace el primer diagnóstico prenatal de una enfermedad genética utilizando el ADN.

En la década de los 80' se comienza a utilizar la tecnología del ADN recombinante en el estudio de diversas enfermedades, no solamente aquella con un definido componente genético. Sin embargo es en el estudio del cáncer en donde esta tecnología permite obtener información muy importante con respecto al origen del proceso trasformativo, el descubrimiento de los oncogenes y posteriormente de los genes supresores tumorales permitió entender mejor las bases moleculares del cáncer,

También en esta década aparecen los primeros animales transgénicos, en la etapa embrionaria se insertan genes de otro organismo y se consigue la expresión de estos genes extraños en el nuevo animal. Precisamente en 1982 se consigue crear un ratón transgénico que tenía el gen de la hormona de crecimiento humana. En los años siguientes se hacen nacer en los laboratorios animales transgénicos portadores de enfermedades humanas, como enfermedades cardiovasculares, degenerativas, neurológicas, cáncer, etc. Esto permite grandes avances en el conocimiento de dichas enfermedades ya que se podían programar diversos experimentos imposibles de ser realizados en humanos.

En 1983 Mullis (5) describe un método alternativo para clonar genes, que superaba en diversos aspectos al procedimiento del ADN recombinante, se trataba de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, siendo premiado con el Nobel en 1984. Esta tecnología comenzó a tener grandes aplicaciones en medicina y su uso comenzó a ser rutinario en muchos laboratorios en el estudio, diagnóstico y monitoraje del tratamiento de varias enfermedades. Ya en pleno siglo XXI se consiguió perfeccionar esta técnica con la denominada PCR-tiempo real.

En 1990 se aprueba el protocolo para hacer terapia génica en una niña de 4 años portadora de un síndrome de inmunodeficiencia ocasionado por la falta de la enzima adenosina desaminasa (ADA). Las propias células de la paciente obtenidas mediante una punción de médula ósea fueron infectadas con un retrovirus que contenía en gen normal de la ADA y luego de demostrarse "in vitro" que tales células habían incorporado el gen y que comenzaban a producir la enzima ausente, se regresaron a la paciente. El resultado fue bastante alentador, tanto así que se ensayaron nuevos tratamientos de este tipo en otras enfermedades abriéndose así una posibilidad importante tan pronto se superen algunos aspectos metodológicos que interfieren (6).

A fines de la década de los 80' comenzó a cobrar fuerza el desarrollo del Proyecto Genoma Humano (7). En un comienzo Watson asumió la dirección ejecutiva del Proyecto, pero a los poco tiempo renunció en vista del incumplimiento de algunos investigadores de publicar las secuencias del ADN humano que iban determinando. El uso de vehículos clonadores que permitían poner insertos muy grandes como de 106 nucleótidos, como el cromosoma artificial de levadura (YAC) y el cromosoma artificial bacteriano (BAC), además del diseño de métodos más rápidos y casi automatizados para la secuenciación fueron decisivos para el logro del objetivo.

El 6 de abril de 2000 se anunció públicamente la terminación del primer borrador del genoma humano secuenciado que localizaba a los genes dentro de los cromosomas. Los días 15 y 16 de febrero de 2001, las dos prestigiosas publicaciones científicas americanas, Nature y Science, publicaron la secuenciación definitiva del Genoma Humano, con un 99.9% de fiabilidad y con un año de antelación a la fecha presupuesta (8). Se pudo determinar que el tamaño del genoma humano era de 3000 millones de pares de nucleótidos distribuidos en nuestros 23 pares de cromosomas. Este logro, considerado por muchos como el avance científico más importante hasta hoy logrado, se completó definitivamente en el 2004.

Incluso antes del inicio del Proyecto Genoma Humano, se secuenció el genoma del virus Fi X 174(5386 pb) y el ADN mitocondrial (16569pb). Más

tarde se secuenció el genoma del *Haemophilus influenzae*. En pleno desarrollo del Proyecto Genoma Humano se secuenció el genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, luego el del gusano *C. elegans*, de la *Drosophila* y varios más entre los que destacan el del ratón y la rata. La secuenciación de otros genomas ayudó a completar la secuenciación del genoma humano.

PERIODO POSTGENÓMICO Y LA FARMACOGENÓMICA

La culminación de la secuenciación completa del genoma humano proporcionó una valiosa información acerca de la estructura de todos los genes, cuyo número real era de 24 000 y no de 100 000 como se suponía. Una de las primeras aplicaciones de este importante logro fue el diseño de los microarreglos de ADN, que son dispositivos que contienen miles de secuencias de ADN pegadas a un soporte y que permite detectar el funcionamiento de decenas de miles de genes a la vez superando con ventaja a otros procedimientos que solo permitían estudiar un gen. La aplicación de los microarreglos o microchips de ADN como hoy también se le llama frecuentemente está posibilitando estudiar la expresión de miles de genes en cada individuo contribuyendo al diagnóstico de una serie de enfermedades e incluso haciendo la detección de ellas antes que se manifiesten (9).

Hace más de 50 años se reconoció que la respuesta diferente que tienen los individuos a los fármacos depende en mucho de la estructura de sus genes y esto marcó el nacimiento de la farmacogenética. Sin embargo, en estos casos se consideraba que un solo gen determinaba la acción de un fármaco específico, cuando en realidad son muchos los genes que tienen que ver con el metabolismo de los fármacos, además de su transporte y de los receptores que necesita. El desarrollo del genoma humano hizo posible que se estudiara la estructura y el funcionamiento de los diferentes genes involucrados en el metabolismo de los fármacos y esto permitió el nacimiento de la farmacogenómica considerada por muchos como la aplicación más inmediata del conocimiento del genoma humano, que hizo el hombre(10).

Si bien las enzimas encargadas del metabolismo de los fármacos son muchas, se reconoce que aquellas pertenecientes al grupo del citocromo P-450 resultan ser las más importantes. Más del 90% del metabolismo de las drogas en los humanos es realizada por 6 isoenzimas del Citocromo P-450: la 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 Y 3A4. Como cada una de estas enzimas puede metabolizar diversos tipos de fármacos se pueden explicar diferentes tipos de interacción de fármacos cuando se administra al paciente fármacos que son metabolizados por la misma enzima. Si el médico tuviera previamente la información del estado funcional de las enzimas del paciente que metabolizarán el fármaco a prescribir, evitaría fallas en el tratamiento, como respuesta insuficiente, presencia de cuadros de toxicidad, que se podrían superar al modificar la dosis o utilizar otro fármaco. Este es el gran reto de la farmacogenómica y en este sentido en los últimos años se han realizado importantes avances, precisando algunas características del funcionamiento de los genes del metabolismo de las drogas asociadas a ciertas poblaciones; hace dos años aparecieron los primeros microchips de ADN para detectar individualmente el funcionamiento de los genes relacionados al metabolismo de los xenobióticos. También se ha descrito el uso de la técnica del polimorfismo de nucleótido único (SNP) para hacer la detección de las mutaciones en los genes relacionados al metabolismo de las drogas y que permite predecir la utilidad de un fármaco en determinado individuo.. Muchos de estos SNPs han sido encontrados en genes que tienen que ver con la acción de los fármacos y se han asociado con cambios significativos en la actividad de la proteína que participa como enzima, receptor, transportador, blancos, etc. de drogas (11).

En los últimos años nos hemos interesado en estudiar los determinantes genéticos que tienen que ver con el metabolismo de las drogas en el habitante peruano, en vista que prácticamente no hay información al respecto. Precisamente uno de mis estudiantes del curso de Biotecnología Médica del Programa de Ingeniería Biotecnológica se interesó en el tema y junto con el Dr. Marco

López, académico de la Universidad de Harvard diseñamos el Proyecto titulado "Identificación de los polimorfismos de nucleótido único de los citocromos P450: CYP2C9 y CYP2C19 en la farmacogenómica de una población quechua del Perú". La mayor parte de los resultados obtenidos formaron parte de la Tesis del ahora Ingeniero Biotecnólogo José Carpio.

La población usada para el estudio correspondió a 60 voluntarios (25 mujeres y 35 varones) de la comunidad de Cantería, de Lampa-Puno. Los genes seleccionados fueron los de las enzimas CYP2C9 y CYP2C19 que representan el 20% de la actividad del citocromo P-450 del hígado y que están involucrados en el metabolismo de antiinflamatorios no esteroideos, antiepilépticos, anticoagulantes, antihipertensivos, ansiolíticos, etc.

Los resultados encontrados muestran variaciones importantes en los genes estudiados en la población quechua y que podrán ser utilizados para optimizar el tratamiento con diversos fármacos.

Posteriores estudios que se harán permitirán conocer mejor el estado funcional de un mayor número de genes encargados de metabolizar estos fármacos y con ello no solo se conseguirán las respuestas esperadas sino que se evitará el usar fármacos que no tendrán efecto y además prevenir las acciones tóxicas que pudieran tener con nuestras poblaciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Watson J.D. and Crick F.H.C. (1953) Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid *Nature* 1971:740-741
2. Kornberg A. & Baker T.A, (1991), *DNA replication II* Ed. Freeman and Company New York
3. Crick F.H.C. (1966) The genetic code *.Sci.Am* 215: 55-62
4. Jackson D., Symons R. and Berg P. (1972) Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of SV 40. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA* 69:2904-2909
5. Mullis K.B. (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262: 56-65
6. Somia N and Verma I.M. (2000) Gene therapy. Trials and tribulations (review) *Nat. Rev Genetic* i: 91-99
7. Watson J.D. (1990) The human genome Project: past, present and future. *Scienc* 248: 44-48
8. Venter J. C., Adams M. D., Myers E.W., Li P.W. Mural R.J. et al (2001) The sequence of the human genome *Science* 291: 1304-1351
9. Shalon D., Smith J.S. and Brown P.O. (1996) A DNA microarray system for analyzing of complex DNA samples *Genome Res.* 6:639-645
10. Wang L. and Weinshilboum R. (2008) Pharmacogenomics: candidate gene identification, functional validation and mechanisms. *Hum. Mol. Genet.* 15: 174-179
11. Nebert, Ge Zhang D, and VesellElliot S.(2009)From Human Genetics and Genomics to Pharmacogenetics and Pharmacogenomics: Past Lessons, Future Directions.*Drug Metab Rev.* 2008; 40(2): 187–224.