

Medicina genómica

Un camino
hacia la medicina
personalizada

Adriana María Salazar Montes
Luis Daniel Hernández Ortega
coordinadores



ALFABÉTICA





Rector General

Ricardo Villanueva Lomelí

Vicerrector Ejecutivo

Héctor Raúl Solís Gadea

Secretario General

Guillermo Arturo Gómez Mata

**Coordinadora General Académica
y de Innovación**

María Esther Avelar Álvarez



**Rector del Centro Universitario
de Ciencias de la Salud**

José Francisco Muñoz Valle

Secretaria Académica

Beatriz Verónica Panduro Espinoza

Secretaria Administrativa

Saralyn López y Taylor

**Directora de la División de Disciplinas
Básicas para la Salud**

Norma Alicia Ruvalcaba Romero

Director de la División de Disciplinas Clínicas

Eduardo Gómez Sánchez

**Directora de la División de Disciplinas
para el Desarrollo, Promoción
y Preservación de la Salud**

Gabriela Macedo Ojeda

Coordinador de Innovación Educativa y Calidad

Juan Francisco Flores Bravo

COMITÉ EDITORIAL CUCS

Presidente

José Francisco Muñoz Valle

Secretaria

Edith Oregon Romero

Secretarios Técnicos

Alexis Missael Vizcaíno Quirarte
Ma. de los Ángeles Villegas

**Directora de la Colección
de Publicaciones Científicas**

Juliana Marisol Godínez Rubí

Directora de la Colección de Difusión

Georgina Vega Fregoso

Directora de la Colección

de Libros de Texto
Alma Marina Sánchez Sánchez

Director de la Colección de Divulgación

Francisco Javier Turrubiates Hernández

**Directora de Comisión de Análisis,
Impacto y Relevancia Científica,
Curricular, Social e Institucional**
Beatriz Verónica Panduro Espinoza

Profesor Dictaminador Invitado Externo

Iván Manuel Girón Pérez

Medicina genómica

**Un camino hacia
la medicina personalizada**

Adriana María Salazar Montes

Luis Daniel Hernández Ortega

coordinadores



ALFABÉTICA

La presente obra cuenta con el dictamen
No. CUCS/CE/0009/24 del Comité Editorial
del Centro Universitario de Ciencias de la Salud.

ALFABÉTICA

**D.R. © 2024, Editorial Innovación
Educativa S. A. de C. V.**

Lábaro Patrio 264, Conjunto Patria
45150, Zapopan, Jalisco

Primera edición, 2024

Coordinadores

Adriana María Salazar Montes
Luis Daniel Hernández Ortega

Autores

- | | | |
|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| › Adriana María Salazar Montes | › Francisco Antonio Guillermo | › José Villanueva Torres |
| › Alejandra Natali Vega Magaña | › Mateos Ramírez | › Lourdes Mónica Bravo Anaya |
| › Alejandro Arellano Pérez | › Griselda Hernández Tapia | › Luis Daniel Hernández Ortega |
| › Alberto Gutiérrez Becerra | › Héctor Fabián Nario Chaidez | › Mariana Saraí Pérez Robles |
| › Andrés López Quintero | › Itzae Adonai Gutiérrez Hurtado | › Nadia Tatiana García |
| › Belinda Vargas Guerrero | › Jesús Fernando Guerrero | › Barrientos |
| › Carmen Magdalena Gurrola | › Rodríguez | › Paloma Lucía Guerra Ávila |
| › Díaz | › Jorge Adrián Ramírez de | › Raúl Cuauhtémoc Baptista |
| › Eber Josué Carrillo Martínez | › Arellano Sánchez | › Rosas |
| › Erika Martínez López | › Jorge Hernández Bello | › Scarlett Elizabeth López |
| › Estefanía Domínguez Fonseca | › Jorge Ramón Padilla Gutiérrez | › Álvarez |
| › Edgar Benjamín Figueroa | › Jorge Vergara Galicia | › Susana del Toro Arreola |
| › Ochoa | › José Alonso Aguilar Velázquez | › Wendy Yareni Campos Pérez |
| › Eva Solís Sta | › José María Vera Cruz | › Yeminia Maribel Valle |
| › Fabiola Solórzano Ibarra | › José Miguel Moreno Ortiz | › Delgadillo |

Noviembre de 2024

Agradecemos el invaluable apoyo para la publicación
de este libro a la Universidad de Guadalajara, institución
referente en la promoción de la educación y la cultura.

Impreso y hecho en México / *Printed and made in Mexico*



Este trabajo está autorizado bajo la licencia Creative Commons Atribución-NoComercialSinDerivadas 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND) lo que significa que el texto puede ser compartido y redistribuido, siempre que el crédito sea otorgado al autor, pero no puede ser mezclado, transformado, construir sobre él ni utilizado con propósitos comerciales. Para más detalles consúltese <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>

Índice

Prólogo	7
CAPÍTULO 1	
Situación de la medicina genómica en México y en el mundo	9
CAPÍTULO 2	
Genética de poblaciones	14
CAPÍTULO 3	
Estudios de asociación mediante genómica comparativa	34
CAPÍTULO 4	
Medicina genómica en obesidad	47
CAPÍTULO 5	
La medicina genómica de la diabetes mellitus	63
CAPÍTULO 6	
Medicina genómica aplicada a la nutrición	82
CAPÍTULO 7	
Papel de la farmacogenética y farmacogenómica en la medicina personalizada	97

CAPÍTULO 8	
Organismos transgénicos con aplicación en la medicina	117
CAPÍTULO 9	
Aplicaciones de RNA de interferencia en la medicina	131
CAPÍTULO 10	
Avances en medicina regenerativa y terapia celular	148
CAPÍTULO 11	
Marcadores genéticos en la identificación humana	171
CAPÍTULO 12	
Diagnóstico genómico pre- y postimplantación embrionaria	189
CAPÍTULO 13	
Generación de vacunas de ácidos nucleicos: DNA o RNA	212
CAPÍTULO 14	
Biomateriales y nanopartículas de uso médico	228
CAPÍTULO 15	
Anticuerpos monoclonales: una poderosa herramienta biológica para enfermedades crónico degenerativas	248
CAPÍTULO 16	
CRISPR/CAS: edición de genomas	270
Semblanzas	288

Prólogo

La medicina genómica ha emergido como una de las disciplinas más revolucionarias de la medicina moderna, transformando radicalmente nuestra forma de abordar los problemas de salud a nivel global. Los avances en ingeniería, biotecnología e informática se han integrado progresivamente en el ámbito médico, permitiéndonos realizar diagnósticos más precisos y oportunos para enfermedades que antes eran difíciles de detectar. La tecnología disponible hoy en día nos faculta para analizar vastas cantidades de información en poco tiempo y, con base en esos datos, ofrecer tratamientos adecuados y personalizados, lo que aumenta significativamente las probabilidades de curación. En este sentido, terapias novedosas, como la terapia génica, la terapia celular, el uso de biomateriales y anticuerpos monoclonales, se han sumado como un pilar fundamental en muchos tratamientos. En casos donde aún no existe un tratamiento efectivo, un diagnóstico precoz puede hacer más lento el progreso de la enfermedad y proporciona a los pacientes una mejor calidad de vida.

Es asombroso reflexionar sobre el progreso de la biomedicina desde la época del Proyecto Genoma Humano, iniciado en 1990, cuando la secuenciación del genoma de cinco individuos requirió 13 años y una inversión de 3 mil millones de dólares. Hoy, gracias a los secuenciadores de última generación, es posible secuenciar el genoma completo de una persona en cuestión de horas y a un costo significativamente menor. Este avance ha democratizado el acceso a la medicina genómica, beneficiando a un número cada vez mayor de pacientes con enfermedades crónicas no solo con un diagnóstico acertado, sino que, al mismo tiempo, permite vincular enfermedades con posibles patrones genéticos por medio de estudios de asociación del genoma completo.

Estamos viviendo una era en la que la medicina tiende a ser personalizada, considerando la carga genética individual de cada paciente. La práctica de recetar tratamientos generales para todos los pacientes con una misma enfermedad está quedando atrás gracias a la farmacogenética y farmacogenómica; la misma tendencia es observada en la nutrición con la aparición de la nutrigenética y la nutrigenómica. Actualmente, los tratamientos deben ser diseñados específicamente en función del perfil genético de cada persona.

Este libro tiene como objetivo proporcionar al lector un panorama amplio y actualizado sobre las principales aplicaciones de la medicina genómica en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades crónicas prevalentes en la era moderna, como la diabetes, la obesidad y el cáncer, para las cuales, hasta ahora, no existían tratamientos efectivos. La medicina genómica ofrece a estos pacientes una renovada esperanza de vida.

Esperamos que el contenido de esta obra despierte en el lector el mismo interés y entusiasmo que sentimos al desarrollarlo, y que inspire a profundizar en este fascinante campo.

Adriana María Salazar Montes
Luis Daniel Hernández Ortega

Situación de la medicina genómica en México y en el mundo

Adriana María Salazar Montes

Introducción

La medicina genómica es un área de la medicina que utiliza la información genómica de cada individuo para brindarle una atención médica más efectiva y precisa. Con el uso de la medicina genómica podemos diagnosticar enfermedades con mucha más precisión y de manera más oportuna que con la práctica médica convencional. Nos ayuda también a predecir resultados y nos indica la pauta para el mejor tratamiento para el paciente.

Según la revista científica *New England Journal of Medicine*, la medicina genómica es “la aplicación del conocimiento del genoma humano a la práctica médica auxiliándose de la tecnología y de la bioinformática”.

Según la doctora María Victoria Cólica, médica especialista en Genética Médica del hospital Durand en Buenos Aires, Argentina, “la medicina genómica es aquella medicina que permite realizar diagnósticos tempranos y establecer estrategias de prevención personalizadas”, dando la oportunidad de tener una vida más larga y saludable.

Por su parte, el doctor en Bioinformática Adrián Turjanski comenta que “el ADN contiene la información necesaria para entender lo que somos y cómo respondemos a diferentes condiciones, desde alimentación hasta predisposiciones a diferentes enfermedades”.

Gracias al desarrollo del proyecto del genoma humano ha sido posible conocer la secuencia completa de nuestro genoma y nos ha permitido aplicar esa

información en beneficio de nuestra salud. Después de su publicación en 2003, se iniciaron en todo el mundo los proyectos denominados GWAS por sus siglas en inglés (Genome-Wide Association Study), que son estudios de asociación del genoma completo que nos permiten establecer una asociación entre una variación génica y una patología. En estos estudios se compara el genoma de sujetos sanos con el de personas enfermas y se identifican los genes asociados a las enfermedades. Estados Unidos y Europa han sido los pioneros en el desarrollo de estos estudios, pero poco a poco otros países, como Brasil, China, Cuba, Egipto, India, Sudáfrica, Corea del Sur y México, han ido aplicando el uso de la medicina genómica en sus sistemas de salud. En América Latina, México ocupa el cuarto lugar después de Argentina, Chile y Brasil en la aplicación de la medicina personalizada en su población. Los estudios de GWAS han permitido generar lo que conocemos como *perfiles de polimorfismos genéticos*, que muestran índices de riesgo a padecer diferentes patologías, como diabetes, trombosis, cáncer de próstata, cáncer de mama, osteoporosis, entre otras, con la finalidad de dirigir la práctica médica a la medicina personalizada basada en la carga genética de cada paciente.

Medicina genómica en el mundo

Una de las enfermedades que más se han visto beneficiadas con la medicina genómica es el cáncer. A través del análisis genómico de diferentes tumores, así como del DNA y RNA circulantes proveniente de los tumores, se han identificado cambios genómicos específicos. Esta información ha permitido generar un “atlas de cáncer” donde se describen las características genéticas de cada uno de los tumores, lo que a su vez ha permitido desarrollar fármacos específicos para cada tipo de cáncer en particular. Con estas tecnologías se espera que en 20 años el cáncer deje de ser una sentencia de muerte. Otras enfermedades también se han visto beneficiadas con el desarrollo de la medicina genómica. La fibrosis quística, por ejemplo, es una enfermedad genética que hoy se puede diagnosticar fácilmente gracias a la identificación del gen que la causa y, por otra parte, la atrofia muscular espinal cuenta con un tratamiento específico gracias a que se conoce el gen que la ocasiona.

Existen compañías que ofrecen pruebas genómicas para determinar la predisposición a desarrollar ciertas enfermedades, como las enfermedades hereditarias monogénicas, cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, alteraciones del sistema inmune, enfermedades asociadas al envejecimiento, entre otras. Aunado a esto, también se ofrecen análisis para conocer la compatibilidad farmacológica, los orígenes ancestrales, así como pruebas de paternidad y de hermandad.

Otra aplicación importante de la medicina genómica es que hoy en día somos capaces de realizar pruebas genéticas prenatales por métodos no invasivos a través del análisis del DNA del feto en sangre materna desde el primer trimestre del embarazo. Con estas pruebas también es posible conocer el sexo del feto, así como su tipo de sangre. Estas determinaciones se realizan de manera rutinaria en países desarrollados, como Inglaterra y Finlandia.

En cuanto a la farmacología, sabemos que los fármacos están diseñados para que con una dosis específica se obtenga un efecto similar en todos los pacientes. Sin embargo, más del 10% de la población mundial se sale de este rango. La farmacogenómica permite predecir en ese 10% de personas cuáles medicamentos son los más adecuados para un paciente, de acuerdo con su carga genética. Los genes que principalmente se analizan son los de las enzimas metabolizadoras de fármacos, como los del citocromo P450, así como de receptores intracelulares y membranales. Actualmente, existen guías de farmacogenómica para alrededor de 61 fármacos conocidas mundialmente, que ayudan a personalizar la terapia basados en la carga genética del paciente.

Uno de los medicamentos que frecuentemente se usan de manera indiscriminada sin análisis genético previo son los anticoagulantes, como warfarina y rivaroxaban, para personas con problemas cardiovasculares. Sin embargo, entre el 1-7% de los pacientes tratados con estos medicamentos cursan con sangrado severo que pone en riesgo su vida. Por esta razón, desde hace algunos años la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos ha recomendado realizar un diagnóstico genético para ciertas enzimas que participan en su metabolismo a pacientes a los que se le administran estos medicamentos, a fin de determinar la dosis adecuada de manera individual.

Situación de la medicina genómica en México

La medicina genómica, aunque no muy extensamente, ya se aplica también en México. Existen muchas maneras de describir la existencia de la medicina genómica en el país. Algunas personas describen su presencia desde la perspectiva de la aplicación de la biología molecular en el diagnóstico de diversas enfermedades. Otras la ven desde la creación de centros de investigación donde se realizan estudios de medicina genómica, como el Instituto de Medicina Genómica de la UNAM, el Instituto Nacional de Medicina Genómica de la Secretaría de Salud (Inmegen) y algunos otros centros de la iniciativa privada. También se puede ver su presencia desde la atención a los pacientes de ciertas enfermedades a través del diagnóstico y tratamiento analizando el genoma del individuo. En ese sentido, pacientes con enfermedades como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cáncer o fibrosis son sometidos a estudios genéticos, para poder predecir su tratamiento ideal.

Estudios de GWAS realizados en población mexicana nos han permitido conocer al menos parcialmente el genoma del mexicano. Gracias a estos estudios sabemos que existen cientos de variantes genéticas presentes en nuestra población, que son diferentes a las variantes encontradas en otras regiones del mundo, por lo que no se recomiendan aplicar las estrategias de tratamiento implementadas en aquellos países a la población mexicana sin antes realizar un análisis genómico.

En ese sentido, en 2023 se propuso desarrollar el proyecto ORIGEN, una iniciativa del tecnológico de Monterrey que pretende estudiar el genoma de 100 000 mexicanos de 17 ciudades localizadas tanto en estados del norte, centro y sur del país. Hasta el momento se han analizado alrededor de 50 000 personas y se pretende concluir en 2025.

Como consecuencia de todos estos estudios y dada la importancia que tiene el genoma en los procesos de salud/enfermedad, desde hace varios años la asignatura de Medicina Genómica ha sido incluida como parte de la currícula de programas educativos del área de la salud en muchas universidades del país, entre ellas la Universidad de Guadalajara.

Con base en toda esta información podemos aseverar que el entendimiento de la enfermedad de cada persona basados en su genoma y con el apoyo de los sistemas biotecnológicos e informáticos aplicados a la salud nos permitirá, sin lugar a dudas, seleccionar los medicamentos más adecuados para cada individuo, lo que es el sueño de los sistemas de salud de todos los países.

Referencias

- Bell, J. (2004). Predicting disease using genomics. *Nature*, 429(6990), 453-456. <https://doi.org/10.1038/nature02624>
- Burguete, A., Bermúdez-Morales, V. H. y Madrid-Marina, V. (2009). Medicina genómica aplicada a la salud pública. *Salud Pública de México*, 51(3), 379-385.
- Collins, F. S. (1999). Genetics: an explosion of knowledge is transforming clinical practice. *Geriatrics*, 54(1), 41-48.
- Collins, F. S., Green, E. D., Guttmacher, A. E., Guyer, M. S. y US National Human Genome Research Institute (2003). A vision for the future of genomics research. *Nature*, 422(6934), 835-847. <https://doi.org/10.1038/nature01626>
- Granados, J., Mena, L. y García, M. (2015). Historia de la medicina genómica en México. *Revista Especialidades Medico Quirúrgicas*, 20, 340-342.
- Jiménez-Sánchez, G., Valdés, J. y Soberón, G. (2002). Desarrollo de la medicina genómica en México. *Este País*, 139, 17-23.
- Joshi, V. A. y Kucherlapati, R. (2008). Genetics and genomics in the practice of medicine. *Gastroenterology*, 134(5), 1284-1288. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.046>
- Lares-Asseff, I. y Trujillo-Jiménez, F. (2001). La farmacogenética y su importancia en la clínica [Pharmacogenetics and its importance in the clinical]. *Gaceta médica de México*, 137(3), 227-236.
- McKusick, V. A. (2001). The anatomy of the human genome: a neo-Vesalian basis for medicine in the 21st century. *JAMA*, 286(18), 2289-2295. <https://doi.org/10.1001/jama.286.18.2289>

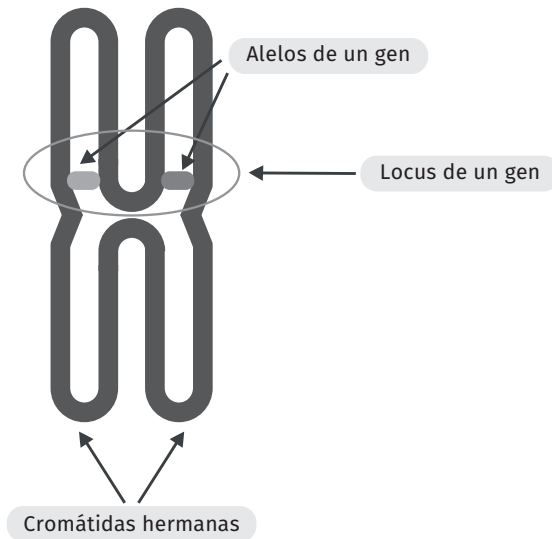
Genética de poblaciones

Jorge Ramón Padilla Gutiérrez

Yeminia Maribel Valle Delgadillo

Diversidad genética entre individuos y poblaciones

Los distintos individuos de una especie determinada no son genéticamente idénticos, sus secuencias de ADN difieren hasta cierto punto, conformando lo que conocemos como diversidad genética. La diversidad genética entre individuos refleja la presencia de diferentes alelos en el acervo genético y, por lo tanto, diferentes genotipos dentro de las poblaciones. Un alelo es la variante alternativa de un gen; cada individuo tiene dos alelos de ese gen, uno de origen paterno y el otro de origen materno. Un gen está ubicado en un lugar específico o físico en el cromosoma conocido como locus y el término loci se emplea para referirse a la posición cromosómica de dos o más genes (véase figura 1). En el caso particular de la fibrosis quística, esta es una enfermedad autosómica recesiva, el loci del gen responsable se encuentra en el cromosoma 7. Para que se manifieste la enfermedad es necesaria la presencia de los dos alelos mutados.

FIGURA 1. ALELO Y LOCUS

Se muestra un cromosoma individual con el locus (posición del gen en el cromosoma); cada gen tiene dos alelos, uno materno y otro paterno.

Variabilidad genética

En genética existen dos expresiones básicas de variabilidad, el fenotipo y el genotipo. El fenotipo corresponde a los atributos observables de un individuo, como la altura, el color de ojos y el color de piel, mientras que el genotipo es el material genético heredado transmitido por los gametos. Cabe destacar que la mayoría de los rasgos son multifactoriales, es decir, existe una interacción entre los genes y el ambiente y que el fenotipo no siempre está correlacionado con el genotipo. Un fenotipo puede estar asociado a múltiples genes y puede expresarse bajo ciertas condiciones ambientales. Por ejemplo, se han identificado alrededor de 50 loci genéticos asociados con el color de ojos; algunos intervienen en la pigmentación de la melanina y otros en la estructura del iris.

La variación genética puede afectar la supervivencia y reproducibilidad de los individuos. De esta manera los alelos para un mismo locus en organismos diploides forman los genotipos en donde existen dos posibilidades; la primera se da

cuando el individuo posee dos alelos idénticos y se conoce como homocigoto, y la segunda es observada cuando ambos alelos son diferentes, es decir, heterocigoto. En organismos homocigotos, la expresión de ese gen puede incluir rasgos menos beneficiosos. La homocigosidad o falta de heterocigosidad es el resultado común de endogamia (reproducción sexual entre individuos estrechamente relacionados), lo que conduce a que dos alelos para un locus determinado sean iguales por ancestría común, o bien por cambios aleatorios en las frecuencias alélicas de una generación a otra, lo que conocemos como deriva génica o deriva genética.

Efecto de la variabilidad genética en las poblaciones

La variación genética en una población se deriva de una amplia variedad de genes y alelos. La persistencia de las poblaciones a lo largo del tiempo en entornos variables depende de su capacidad para adaptarse a las cambiantes condiciones del medio ambiente. A veces, la adición de un nuevo alelo a una población la hace más apta para sobrevivir; en otras ocasiones, esa adición la hace menos capaz y, en algunas otras, la adición de un nuevo alelo no tiene ningún efecto. Sin embargo, ese nuevo alelo persistirá en las siguientes generaciones porque su contribución a la supervivencia es neutral.

Factores que influyen en la diversidad genética

En una población, la emigración de genes, la mutación y la recombinación son las principales fuentes de variación. Sin embargo, la emigración no produce variación genética que genere homocigotos, a diferencia de los heterocigotos que sí contribuyen a la generación de mayor diversidad en periodos tan cortos como el de una generación. En el mismo sentido, la recombinación solo conduce a variación si los alelos de distintos loci se heredan de forma independiente el uno del otro, es decir, no se heredan ligados en bloque. En este sentido se han encontrado varias regiones en el genoma en fuerte desequilibrio de ligamiento (un concepto que se abordará más adelante), lo que implica que la variabilidad por recombinación es diferente cuando se analiza por distintas regiones en el genoma. Finalmente, la mutación invariablemente es la principal fuente de variación debido a que es, en esencia, el mecanismo biológico primigenio de generación de nuevos alelos.

Equilibrio de Hardy-Weinberg

En genética de poblaciones se considera que, bajo ciertas condiciones, de las cuales la más importante es el apareamiento al azar, la distribución de los genotipos está determinada por las frecuencias génicas en la población. Este comportamiento se conoce como la ley Hardy-Weinberg (HWE), expuesta por Godfrey H. Hardy y Wilhelm Weinberg en 1908. La ley es un modelo matemático que evalúa el resultado de la reproducción en las frecuencias alélicas y genotípicas en una población. Además de determinar en función de las frecuencias alélicas, las frecuencias genotípicas, esta ley predice el mantenimiento de tales frecuencias de una generación a otra.

Los factores que son capaces de romper el equilibrio de HWE son principalmente el apareamiento no azaroso, la mutación, la selección y la migración. Según el HWE, para dos alelos (A y a) con un locus con las frecuencias correspondientes p y q, son posibles tres genotipos: AA, Aa y aa con las frecuencias esperadas p^2 , $2pq$, q^2 , respectivamente.

Matemáticamente, esto involucra la expansión binomial: $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$ (véase figura 2). Consideremos el ejemplo de la variante en el promotor del gen TNF- α -1031C>T (rs1799964) en 164 individuos control (328 alelos) y 254 pacientes con síndrome coronario agudo provenientes de población mexicana. En sujetos control la frecuencia observada del genotipo silvestre C/C, heterocigoto C/T y homocigoto polimórfico (T/T) es 102, 49 y 13 respectivamente. La frecuencia alélica se estima de acuerdo con la genotípica.

- ♦ Frecuencia del alelo C: se consideran dos alelos en el genotipo C/C ($102 \times 2 = 204$) + (49) en el genotipo C/T. $204 + 49 = 253$ alelos C, la frecuencia calculada es $253/328 = 0.77$.
- ♦ Frecuencia del alelo T: se consideran dos alelos en el genotipo T/T ($13 \times 2 = 26$) + (49) del genotipo C/T. $26 + 49 = 75$ alelos T. La frecuencia calculada es $75/328 = 0.23$ o bien $1-p$ ($1-0.77 = 0.23$).

TABLA 1. FRECUENCIA ALÉLICA

ALELOS	FRECUENCIA ALÉLICA OBSERVADA
p (C)	253 (0.77)
q (T)	75 (0.23)
Total (2n)	328

Los genotipos esperados se estiman de acuerdo con el binomio de Newton: p^2 (C/C), $2pq$ (C/T), $(T/T) q^2$, donde p es la frecuencia del alelo silvestre y q la del alelo polimórfico. Para calcular si existen diferencias significativas entre los genotipos observados y esperados se calcula una prueba χ^2 (véase figura 2):

$$\frac{(\text{genotipos observados} - \text{esperados})^2}{\text{genotipos esperados}}$$

TABLA 2. FRECUENCIA GENOTÍPICA

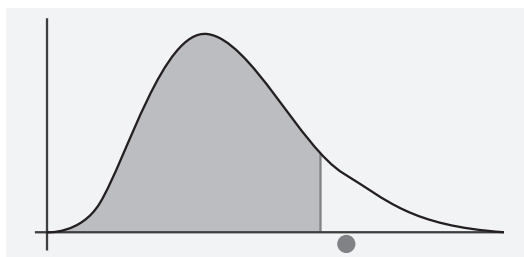
GENOTIPOS	FENOTIPOS	FRECUENCIA GENOTÍPICA OBSERVADA	FRECUENCIA GENOTÍPICA ESPERADA
C/C	C	102 (0.62)	p^2 ($0.77 * 0.77 * 164$) = 97
C/T	C/T	49 (0.30)	$2pq$ ($2 * 0.77 * 0.23 * 164$) = 58
T/T	T	13 (0.08)	q^2 ($0.23 * 0.23 * 164$) = 8.67
Total (n)		164	

Grados de libertad: número de fenotipos – número de alelos: $3 - 2 = 1$ grado de libertad, 95% confianza.

TABLA 3. NUMERO DE FENOTIPOS – NÚMERO DE ALELOS

GENOTIPOS OBSERVADOS – ESPERADOS	(OBSERVADOS – ESPERADOS) ²	(OBSERVADOS – ESPERADOS) ² /ESPERADOS
$102 - 97 = 5$	$5^2 = 25$	$25/97 = 0.26$
$49 - 58 = -9$	$-9^2 = 81$	$81/58 = 1.39$
$13 - 8.67 = 4.33$	$4.33^2 = 18.75$	$18.75/8.67 = 2.16$
		Suma = 3.81

- ♦ Hipótesis nula: sumatoria de $\chi^2 < 3.841$, existe equilibrio Hardy-Weinberg.
- ♦ Hipótesis alternativa: sumatoria de $\chi^2 > 3.841$, no existe equilibrio Hardy-Weinberg.

FIGURA 2. CÁLCULO DE PROBABILIDADES DE χ^2 **La distribución χ^2** Cálculo de probabilidades de la χ^2 Percentiles de la distribución χ^2 $F(a) = P(X \leq a)$ 

N	0.995	0.99	0.975	0.95	0.9	0.75	0.5	0.25	0.05	0.025	0.01	0.005
1	7.879	6.635	5.024	3.841	2.706	1.323	0.455	0.102	0.004	0.001	0.000	0.000
2	10.597	9.210	7.376	5.991	4.605	2.773	1.386	0.575	0.103	0.051	0.020	0.010
3	12.838	11.345	9.348	7.815	6.251	4.108	2.366	1.213	0.352	0.216	0.115	0.072
4	14.860	13.277	11.143	9.488	7.779	5.385	3.357	1.923	0.711	0.484	0.297	0.207
5	16.750	15.036	12.833	11.070	9.236	6.626	4.351	2.675	1.145	0.831	0.554	0.412
6	18.548	16.812	14.449	12.592	10.645	7.841	5.348	3.455	1.635	1.237	0.872	0.676

Los grados de libertad (N) se extrapolan con el nivel de confianza. El valor que se encuentra dentro del área bajo la curva (menor al encontrado) es no significativo.

Interpretación: en este ejemplo la sumatoria de la prueba χ^2 es 3.84, por lo que la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg, es decir, las frecuencias genotípicas son explicadas por el producto de las frecuencias alélicas individuales y permanecen constantes de generación en generación en la población analizada.

Deriva génica

Uno de los supuestos en el modelo del equilibrio Hardy-Weinberg es que la población tiene un tamaño grande e infinito. En poblaciones con tamaño finito, el valor esperado de las frecuencias alélicas permanecerá constante, pero su

varianza se incrementará de una generación a la siguiente. Esto implica que eventualmente un alelo no sea transmitido por efectos de azar. El efecto del tamaño de muestra influye significativamente en la interpretación del EWH. Por lo tanto, entre más grande sea la muestra, para un ejemplo de dos alelos en la población, más cercana es la probabilidad de que las frecuencias observadas y esperadas sean iguales. En este sentido, en poblaciones pequeñas o no representativas los efectos de la deriva génica son más acentuados, es decir, un rasgo dominante podría eventualmente desaparecer en esa población. Por lo que la deriva génica es un proceso evolutivo, pero los rasgos afectados por la misma no se relacionan con la reproducción y la supervivencia del individuo. La pérdida de heterocigosidad es otro efecto de la deriva génica por pérdida de algunos alelos. La variación en cierto locus va a disminuir y eventualmente se va a perder.

Estos resultados serían ejemplificados utilizando el ejemplo de una población constante, finita, homogénea y con apareamiento azaroso; con solo dos alelos y sin evidencia de mutación o selección (lo que se conoce como el modelo de Fisher en honor a Sewell Wright y Ronald Fisher quienes fueron los pioneros en investigar el fenómeno de deriva en los años 1930). Este modelo pronostica la variación de las frecuencias alélicas en poblaciones sometidas a la acción de deriva génica; asume los principios del EWH en poblaciones finitas.

Efecto fundador y cuello de botella

Es claro que la deriva génica se manifiesta en poblaciones pequeñas, en donde los alelos que no son tan frecuentes tienden a perderse en la población. En un ejemplo biológico, este fenómeno puede hacerse presente con un evento catastrófico (como una avalancha o un terremoto) que elimine a un número importante de miembros de la población creando un “cuello de botella”. Otro ejemplo de cuello de botella es el “efecto fundador”, donde un número importante de individuos se separa de la población inicial y se desarrolla de manera aislada.

Un ejemplo en poblaciones humanas son los amish. Los amish son un grupo religioso con un estilo de vida simple, libre de tecnología y otras comodidades actuales. Viven en colonias repartidas a nivel mundial y son descendientes de inmigrantes de lengua alemana. Tienen normas de vida muy estrictos y son una comunidad cerrada que solo se reproduce entre los mismos integrantes. Esto genera que

sean portadores de enfermedades genéticas raras, como el síndrome de Ellis-van Creveld. Este síndrome es de carácter autosómico recesivo (ambos alelos afectados) con rasgos de enanismo y de polidactilia (número elevado de dedos, mayor a cinco dígitos). Afecta el crecimiento óseo, ausencia de uñas o malformaciones en ellas, anormalidades dentales y defectos cardíacos congénitos. Más de la mitad de los afectados tienen mutaciones en los genes EVC (del inglés *EvC ciliary complex subunit 1*) o EVC2 (del inglés *EvC ciliary complex subunit 2*), que producen una proteína implicada en el desarrollo y crecimiento normal de huesos y dientes. Ambos genes están ubicados en el cromosoma 4 y se cree que trabajan de manera coordinada.

Endogamia

La endogamia, es definida como el apareamiento entre individuos de una misma comunidad, etnia o población genéticamente aislada, en donde se observa una elevada proporción de genotipos homocigotos para diferentes loci cromosómicos.

El grado de endogamia o consanguinidad en la descendencia aumenta proporcionalmente a la similitud genética de sus antepasados, en contraste con los individuos que se seleccionan al azar de una población determinada.

El coeficiente de endogamia (F) permite evaluar o medir el grado de endogamia, en donde se evalúa la probabilidad de que dos alelos sean iguales por ascendencia y no por el azar. F puede tomar valores en el rango de 0 a 1, en donde 0 indica apareamientos azarosos en una población y 1 revela que todos los alelos son iguales por ascendencia. Por lo tanto, los individuos endogámicos solo pueden resultar del apareamiento entre ancestros estrechamente relacionados.

Cuando se produce la endogamia, las frecuencias de los genotipos será:

$$f(AA) = p^2 + Fpq; f(Aa) = 2pq - 2Fpq; f(aa) = q^2 + Fpq$$

Con la endogamia, la proporción de heterocigotos disminuye y aumenta la proporción de homocigotos por cada generación, lo que aumenta el riesgo de efectos deletéreos de genes recesivos, que pueden influir negativamente en el desempeño productivo promedio en la población, un fenómeno conocido como depresión por endogamia. Por tanto, la endogamia causa una desviación en

las frecuencias esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg de p^2 , $2pq$ y q^2 . Las posibles causas de la disminución del valor fenotípico como consecuencia de la endogamia incluyen el hecho de que los genes favorables tienden a ser dominantes o parcialmente dominantes.

Se ha documentado que la endogamia incrementa el riesgo de muerte infantil: los hijos de primos hermanos tienen 40% de incremento en la mortalidad en comparación con la observado entre hijos de individuos genéticamente no relacionados, desafortunadamente no hay información en relación con el impacto en el caso de hijos entre hermanos, pero se esperaría que el incremento fuese aún mayor.

Mutación, selección y adaptabilidad

Durante la fase S en el ciclo celular se replica el ADN, sin embargo, el proceso no está libre de errores y es cuando se generan las mutaciones. Existen diversos factores que favorecen la aparición de mutaciones, tales como mutágenos químicos (algunos elementos químicos), mutágenos biológicos (infección por algunos virus) y mutágenos físicos (radiación ionizante). Las mutaciones se consideran del tipo germinal cuando se afectan a las células germinales, que son los óvulos y espermatozoides, que pueden o no ser heredadas y somáticas cuando se afectan a las otras células que no son germinales y que no se heredan.

De acuerdo con el grado de afectación las mutaciones pueden clasificarse en tres distintos niveles: las de tipo molecular también conocidas como génicas o puntuales, cuya afectación es al nivel de unas cuantas bases del DNA. Las de tipo cromosómico en donde el segmento afectado es incluso mayor al tamaño de uno o más genes alterando la estructura del cromosoma. Finalmente, se encuentran la de tipo genómico afectando el número de cromosomas de forma individual (ganancia o pérdida de un cromosoma), o bien afectando el número de juegos completo de cromosomas como las poliploidías (aumento) o haploidías (reducción).

Una mutación es un cambio en el DNA que se hereda y es estable, su frecuencia en la población es menor al 1%. Un polimorfismo o variante genética tiene la misma definición, pero difiere por la frecuencia, es decir, si la frecuencia en la población del alelo menor es superior al 1% nos estamos refiriendo

a un polimorfismo. Es importante mencionar que no todas las mutaciones o polimorfismos están asociados con una patología, algunos de ellos son considerados benignos, ya que su presencia confiere a los individuos protección al desarrollo de ciertas enfermedades.

Los genotipos que se generan por mutaciones o recombinación y en respuesta al medio ambiente pueden derivar en cambios en la especie, afectando las habilidades de sobrevivencia y reproducción. Lo anterior conduce a un proceso de selección y cambios en las distribuciones de los genotipos en una población.

La selección natural ocurre cuando los individuos portadores de algunos genotipos tienen más posibilidades de sobrevivir y reproducirse y, en consecuencia, heredan sus alelos a la siguiente generación.

La selección direccional puede ser positiva que conduce a un aumento en las frecuencias de alelos ventajosos o negativa por un aumento de alelos perjudiciales. Considere tres genotipos (AA, Aa y aa), los cuales tienen diferente capacidad ya que los individuos AA engendran, en promedio, más descendencia que los individuos de los otros genotipos. Con el paso de las generaciones el alelo A se convertiría en el más frecuente y se establecería como el dominante en la población hasta fijarse. La velocidad de fijación para los alelos favorables dependerá en cierta medida de la capacidad de dominancia entre los alelos. Una vez que un alelo favorable es el más frecuente en la población, los alelos deletéreos son esencialmente raros.

La selección equilibrada, a diferencia con la selección direccional, mantiene las frecuencias de los alelos estables; un ejemplo sería cuando los heterocigotos poseen mayor aptitud en comparación que los homocigotos, lo que permite que los alelos menos frecuentes permanezcan de una generación a otra sin ser considerados deletéreos.

La aptitud se refiere a la relación existente entre el fenotipo y el entorno en el que vive el organismo. Es importante recordar que el fenotipo depende en gran medida del genotipo, pero no es exclusivo, el entorno también influye. Por lo tanto, para un mismo genotipo habrá diferentes fenotipos dependiendo de los diversos entornos.

Finalmente, se puede producir un equilibrio, debido a que la mutación y la selección natural actúan como fuerzas contrarias en los alelos nocivos. La mutación favorece un incremento en su frecuencia y la selección natural una disminución de esta.

Estructura y diferenciación de las poblaciones

La posibilidad de que se cumpla el EHW radica en el supuesto de que el apareamiento sea azaroso en toda la población. En este contexto, una población se caracteriza por ser una entidad única donde los procesos como el apareamiento y el movimiento de los individuos son uniformes en todas partes, una condición a menudo llamada panmixia. Varios procesos y características que se observan en las poblaciones reales hacen que la uniformidad poblacional sea poco probable para muchas poblaciones.

Dentro de las grandes poblaciones, frecuentemente ocurre que las posibilidades de apareamiento no son uniformes, como lo supusieron Hardy y Weinberg. En cambio, la posibilidad de que dos individuos se apareen a menudo depende de su ubicación dentro de la población. Esto conlleva a lo que se conoce como estructura poblacional, o bien la heterogeneidad en una población, y que está dada según las posibilidades de que dos individuos elegidos al azar se apareen.

Diversos fenómenos pueden intervenir en la estructura de la población y dar lugar a diferencias en las distribuciones alélicas y genotípicas en diferentes porciones en una población. La estructura de la población tiene profundas implicaciones para el genotipo y las frecuencias alélicas. La subdivisión fragmenta a una población en unidades más pequeñas que son genéticamente independientes hasta cierto punto. Una consecuencia es que cada subpoblación tiene un tamaño de población efectivo menor que el tamaño efectivo de toda la población, si hubiera apareamiento aleatorio. Por ejemplo, la vicarianza, definida como el surgimiento de barreras físicas del tipo geológicas o de otro tipo que ocasiona que una población se divida o fragmente. Esto ocasiona la formación de subpoblaciones que, con el paso de las generaciones, pueden comportarse de forma independiente reduciendo el flujo genético (movimiento exitoso de los alelos en las poblaciones a través de la migración).

Otro ejemplo es el aislamiento por distancia, un fenómeno en el que las posibilidades de apareamiento o flujo genético disminuyen a medida que aumenta la distancia geográfica entre individuos o poblaciones.

La variación genética que se encuentra en una población grande panmíctica (población con apareamiento aleatorio) y la que se encuentra en una población subdividida en grupos más pequeños es diferente. Para entender este concepto, podemos considerar el caso “simple” de un locus bialélico. Una población grande puede tardar mucho en experimentar fijación o pérdida debido a la deriva genética y, por lo tanto, mantener ambos alelos. En una población subdividida, cada grupo puede alcanzar rápidamente la fijación o la pérdida, pero ambos alelos pueden mantenerse en la población general, ya que se espera que la mitad de las subpoblaciones alcancen la fijación y la mitad la pérdida para un alelo dado. Los procesos que influyen en la estructura de la población pueden considerarse tanto progresivos como restrictivos en el cambio evolutivo. El aislamiento genético entre grupos causado por la subdivisión puede evitar que alelos nuevos e incluso ventajosos se propaguen por una población. Pero, al mismo tiempo, el aislamiento genético permite que las subpoblaciones desarrollen frecuencias alélicas independientes y mantengan alelos, como se requiere para la adaptación genética a ambientes locales bajo selección natural, por ejemplo.

Estadístico F

Acorde con lo anterior, se ha establecido que puede haber desviaciones de las frecuencias esperadas de Hardy-Weinberg. En heterocigotos estas desviaciones pueden ocurrir en dos niveles:

1. Dentro de cada subpoblación debido al apareamiento no aleatorio
2. Entre subpoblaciones debido a la estructura de la población

Existen estadísticos que pueden medir la desviación de la heterocigosidad esperada basadas en índices de fijación que se usan comúnmente para cuantificar los patrones de subdivisión de la población, o bien conocer la estructura de la población. El índice de fijación, también conocido como el estadístico F, es una medida de la subdivisión de la población y se aplica en el caso de poblaciones en las que hay múltiples subpoblaciones.

El estadístico F puede adaptarse a múltiples niveles de organización de la población. Con subpoblaciones múltiples, puede existir un exceso o déficit de heterocigotos debido al apareamiento no aleatorio dentro de las subpoblaciones y un posible déficit de heterocigotos entre las subpoblaciones en comparación con la panmixia confuso. En el último caso, el estadístico F mostrará cuántas frecuencias alélicas han divergido entre las subpoblaciones debido a procesos que influyen en la estructura de la población en comparación con las frecuencias alélicas ideales y uniformes entre las subpoblaciones esperadas con panmixia. Diferencias entre los genotipos observados y esperados de Hardy-Weinberg se han utilizado para estimar el estadístico F.

Tomando en cuenta el apareamiento no aleatorio y la divergencia de la frecuencia de los alelos de la subpoblación, se han utilizado varias versiones nuevas del estadístico F. Este estadístico puede extenderse para adaptarse a múltiples niveles de organización de la población, creando así medidas de desviación de las frecuencias genotípicas esperadas de Hardy-Weinberg. De hecho, la heterocigosidad en una población es solo uno menos la homocigosidad ($H = 1 - F$), por lo que la heterocigosidad se puede relacionar con el estadístico F.

Las definiciones de estos nuevos estadísticos F, así como los tipos de heterocigosidad se muestran en la tabla 4.

TABLA 4. DEFINICIONES MATEMÁTICAS Y BIOLÓGICAS DE LOS PARÁMETROS DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL

Definiciones biológicas de heterocigosidad para tres niveles de organización de la población		
H_i = la heterocigosidad promedio observada dentro de cada subpoblación.	H_s = la heterocigosidad promedio esperada de las subpoblaciones asumiendo el apareamiento aleatorio dentro de cada subpoblación.	H_T = la heterocigosidad esperada de la población total asumiendo apareamiento aleatorio dentro de subpoblaciones y sin divergencia de frecuencias alélicas entre subpoblaciones.

Definiciones biológicas de los estadísticos F para dos niveles de organización de la población	
$F_{IS} = \frac{H_s - H_I}{H_s}$	La diferencia promedio entre la heterocigosidad observada y la esperada de Hardy-Weinberg dentro de cada subpoblación debido al apareamiento no aleatorio. La correlación entre los estados de dos alelos en un genotipo muestreado al azar de cualquier subpoblación. *I indica individuos y S para subpoblaciones.
$F_{ST} = \frac{H_T - H_s}{H_T}$	La reducción de la heterocigosidad debido a la divergencia de la subpoblación en la frecuencia de los alelos.
	La diferencia entre la heterocigosidad esperada promedio de las subpoblaciones y la heterocigosidad esperada de la población total. Alternativamente, es probable que el muestreo de dos alelos al azar de una sola subpoblación sea igual a la de la población total. *S indica subpoblaciones y T la población total.
$F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T}$	La correlación entre los estados de dos alelos en un genotipo muestreado al azar de una sola subpoblación dada la posibilidad de apareamiento no aleatorio dentro de poblaciones y divergencia de frecuencia de alelos entre poblaciones. *I se utiliza para individuos y T para la población total.

Desequilibrio de ligamiento

El entrecruzamiento cromosómico que ocurre durante la profase (paquitene) de la primera división meiótica representa una fuente de variación y es fundamental para que durante la división celular suceda la correcta segregación de los cromosomas.

Ligamiento se refiere a que dos loci no se separan como dos genes independientes debido a su proximidad dentro del cromosoma en que se encuentran, por lo que la frecuencia de entrecruzamiento o recombinación (FR) entre ellos es menor a la esperada por el azar. En consecuencia, en un determinado cromosoma, la probabilidad de entrecruzamiento es mayor si la distancia entre dos loci es mayor. Por esta misma razón, la distancia entre dos genes puede estimarse con la frecuencia de entrecruzamientos entre ellos mediante el conteo de los cromosomas o haplotipos recombinantes y no recombinantes. De esta manera, la FR se utiliza como medida de distancia genética y se reporta como unidad de mapa o centimorgan (cM), en donde 1 cM equivale al 1% de recombinación. El criterio de ligamiento es una FR menor a 0.5.

Cada copia de un cromosoma, dentro de una población, puede ser caracterizada por un patrón de combinaciones de alelos particulares de las diferentes regiones, que en conjunto comprenden un haplotipo individual. Cuando las frecuencias observadas en una población no corresponden a las frecuencias esperadas de estos haplotipos, se dice que existe desequilibrio de ligamiento. Es decir, que el DL puede definirse como la diferencia entre las frecuencias haplotípicas observadas y esperadas en una población. El DL puede entenderse también como la medida de la tendencia de los alelos de genes diferentes (haplotipo) a heredarse juntos más frecuentemente que lo esperado por el azar. Su definición matemática es la siguiente, donde ij es cada una de las posibles combinaciones alélicas de los dos sitios en estudio:

$$D = F_{Obsij} - F_{Espij}$$

El valor del DL decae a través del tiempo como resultado de la recombinación, es una medida indirecta de la distancia génica entre diversos loci. Además de la recombinación, los factores involucrados en el contexto de evolución (mutaciones, flujo génico, crecimiento y subdivisión de las poblaciones) pueden afectar el valor del DL.

Se conoce que la tasa de recombinación varía en todo el genoma humano, es decir que existen ciertas regiones que son más vulnerables a recombinar (*hot spots* o puntos calientes) en comparación con otras (*cold spots* o puntos fríos), y es por esta razón que se hacen estudios sobre DL.

Herencia mendeliana

Los patrones de expresión génica dependen de dos factores, la dominancia y la localización cromosómica, es decir, autosómica cuando se encuentran en un cromosoma autosómico (cromosomas 1 a 22) o sexual cuando se encuentran en un cromosoma sexual (cromosomas X e Y).

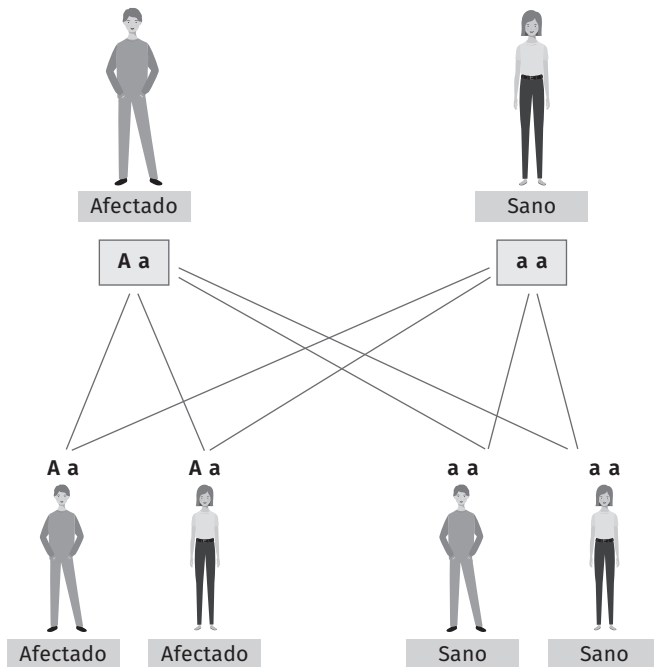
La expresión fenotípica depende de un alelo que domina (dominante, véase figura 3) sobre otro llamado recesivo (véase figura 4). Por ejemplo, en el caso del grupo sanguíneo A, el fenotipo es A y puede ser explicado por dos genotipos A/A o A/O, en donde el grupo sanguíneo A enmascara la presencia del alelo

O, por lo que el alelo A es dominante y O recesivo. En este mismo ejemplo, el fenotipo O siempre será explicado por el genotipo O/O, al ser recesivo se necesitan dos copias del alelo para que pueda ser observable en el fenotipo. En el caso de los alelos A y B, la herencia es codominante, es decir ambos alelos son observables en el fenotipo.

TABLA 5. HERENCIA

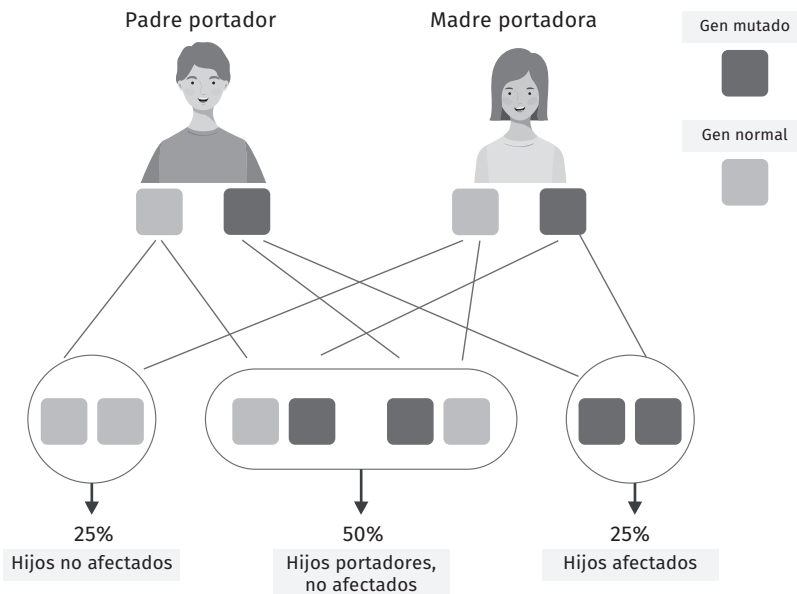
FENOTIPO	GENOTIPOS	HERENCIA
A	A/A, A/O	A: dominante O: recesivo
B	B/B, B/O	B: dominante O: recesivo
AB	A/B	Codominante
O	O/O	Recesiva

FIGURA 3. HERENCIA DOMINANTE



Los individuos portadores de un alelo dominante presentan el mismo riesgo que los homocigotos para ese alelo sin distinción de sexo.

FIGURA 4. HERENCIA AUTOSÓMICA RECESIVA



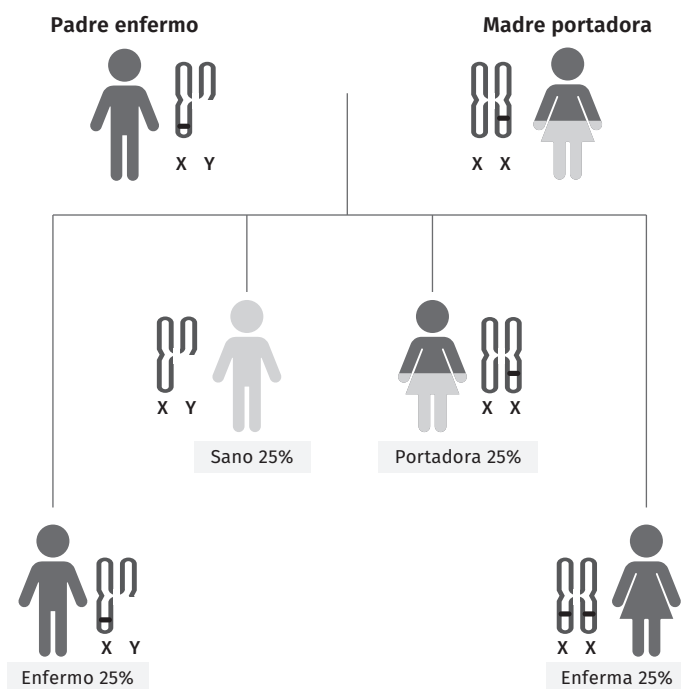
Los afectados tienen la presencia de los dos alelos con la mutación.

Dependiendo del número de genes afectados, la herencia puede ser *monogénica* (determinada por un gen individual) o *poligénica* (interacción de dos o más genes). La mayoría de las enfermedades recaen en la segunda clasificación. Los trastornos de herencia monogénica son identificados principalmente en edades pediátricas, aunque no es exclusivo de este grupo etario; poco menos del 10% se manifiesta después de la pubertad y el 1% posterior a la etapa reproductiva. Existen menos de 5 000 enfermedades monogénicas con 3 163 genes causales identificados. Esta lista sigue a la baja a medida que se conoce la fisiopatología y la interacción genética.

Otros trastornos son exclusivos de la herencia ligada al sexo, es decir asociada a los cromosomas sexuales (véase figura 5). A diferencia de los autosómicos, en donde se ven afectados por igual hombres y mujeres, la herencia ligada al sexo depende del cromosoma afectado. Las mujeres pueden ser homocigotas o heterocigotas para una mutación; en este último caso se denominan portadoras

y pueden presentar un fenotipo enmascarado o menos grave de la enfermedad. Los hombres heredan un cromosoma X materno y el Y paterno; son hemicigotos para el cromosoma X. En este sentido algunas patologías se manifiestan más frecuentemente en varones. Tal es el caso de la hemofilia, trastorno recesivo asociado a fallas en la coagulación, en donde los varones son afectados al poseer una mutación en el cromosoma X. Las mujeres pueden ser portadoras de la mutación y no manifestar la enfermedad, ya que el otro gen compensa el efecto patogénico. Adicionalmente, para compensar el efecto de doble dosis de genes en el cromosoma X en las mujeres, un solo alelo se expresa por la inactivación azarosa del gen presente en el otro cromosoma (corpúsculo de Barr), en este caso, si el gen apagado es el normal, la mujer presentará la enfermedad. En la tabla 6 se muestran las características de los tipos de herencia.

FIGURA 5. HERENCIA LIGADA AL CROMOSOMA X



Los varones son afectados si heredan un cromosoma X materno con la mutación. La condición heterocigota en la mujer puede compensar el efecto si uno de los cromosomas X es normal.

TABLA 6. TIPOS DE HERENCIA

	CARACTERÍSTICA	PREDILECCIÓN POR SEXO	ENFERMEDAD
Autosómica dominante	Una copia del gen afectado es necesaria para que se manifieste la enfermedad. El gen afectado se encuentra en uno de los autosomas. Se encuentra afectado al menos un individuo en cada generación.	Indistinto	Polidactilia
Autosómica recesiva	Se necesitan dos copias para que se manifieste la enfermedad. El gen afectado se encuentra en uno de los autosomas.	Indistinto	Albinismo
Ligada al cromosoma X dominante	Basta con una copia del gen afectado para que se manifieste la enfermedad.	Más común encontrar mujeres afectadas	Síndrome X frágil
Ligada al cromosoma X recesivo	Se necesitan dos copias del gen alterado.	Frecuente en varones	Hemofilia
Ligada al cromosoma Y	Herencia exclusivamente paterna.	Varones	Hipertriosis auricular
Mitocondrial	Herencia materna.	Mujeres y varones que heredan las mitocondrias con la mutación materna	Síndrome de Leigh

Adicionalmente, se deben considerar la penetrancia y expresividad para la manifestación clínica del tipo de herencia, es decir que el genotipo no es determinante en la expresión fenotípica. *Penetrancia* se refiere a la proporción de individuos que tienen un fenotipo específico que es explicado por el genotipo bajo ciertas condiciones ambientales. Por ejemplo, si todos los individuos que portan la mutación muestran el fenotipo, se dice que la penetrancia es completa. La gravedad de la expresión fenotípica en individuos que tienen el mismo genotipo asociado con una enfermedad se conoce como *expresividad*. Si la gravedad difiere entre ellos esto se conoce como *expresividad variable*.

Como conclusión podemos decir que la genética de poblaciones es una rama de la genética que estudia la variabilidad que existe entre individuos y poblaciones desde un enfoque matemático con la finalidad de determinar el impacto que tienen los diferentes procesos tanto biológicos (mutación, selección, adaptabilidad, heredabilidad) como demográficos (endogamia, deriva genética, panmixia) sobre la distribución de las frecuencias alélicas y sus consecuencias evolutivas. Además, provee herramientas que permiten caracterizar poblaciones e identificar factores de riesgo genéticos para el desarrollo de algunas patologías.

Referencias

- Curik, I., Sölkner, J. y Stipic, N. (2001). The influence of selection and epistasis on inbreeding depression estimates. *J Anim Breed Genet*, 118, 247-262. doi: 10.1046/j.1439-0388.2001.00284.x.
- Donoghue, M. J. y Moore, B. R. (2003). Toward an integrative historical biogeography. *Integr Comp Biol*, 43(2), 261-70. doi: 10.1093/icb/43.2.261.
- Falconer, D. S. y MacKay, T. F. C. (1995). *Introduction to Quantitative Genetics* (4a ed.). Longman.
- Hansson, B. y Westerberg, L. (2002). On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations: Heterozygosity-Fitness Correlations. *Molecular Ecology*, 11(12), 2467-2474. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2002.01644.x>
- Hamilton, M. B., & Miller, J. R. (2002). Comparing relative rates of pollen and seed gene flow in the island model using nuclear and organelle measures of population structure. *Genetics*, 162(4), 1897-1909. <https://doi.org/10.1093/genetics/162.4.1897>
- Hermas, S. A., Young, C. W. y Rust, J. W. (1987). Effects of mild inbreeding on productive and reproductive performance of Guernsey cattle. *J Dairy Sci*, 70, 712-715. doi: 10.3168/jds.2002-0302(87)80062-0.
- Natural selection, genetic drift, and gene flow do not act in isolation in natural populations. (s. f.). Nature.com. <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/natural-selection-genetic-drift-and-gene-flow-15186648/>
- Young, C. W. (1984). Inbreeding and the gene pool. *J Dairy Sci*, 67, 472-477. doi: 10.3168/jds.2002-0302(84)81326-0.

Estudios de asociación mediante genómica comparativa

Raúl Cuauhtémoc Baptista Rosas

Introducción

Gran parte de la variación fenotípica en las poblaciones humanas, incluidos los diferentes rasgos morfológicos, biológicos y biomédicos que se heredan de padres a hijos, es “compleja” y “cuantitativa”. Esta variación fenotípica se debe en gran parte a las contribuciones de muchos polimorfismos genéticos heredables. En caso de estar presentes en células germinales se transmiten a la descendencia. Por otro lado, cuando las variantes aparecen en células somáticas, no se heredan. Dada a la gran diversidad celular en tejidos, el reto de identificar esta extensa variabilidad hace complejo el análisis y la interpretación de resultados.

Si bien este es un campo fértil de investigación que aún se encuentra en desarrollo, estos estudios proporcionan importantes conocimientos sobre la arquitectura genómica de los rasgos cuantitativos, es decir, el número de variantes que contribuyen a la variación hereditaria, así como sus frecuencias y la intensidad del efecto. Quizás la observación más sorprendente que se ha obtenido de estos análisis es que, a pesar del gran tamaño de muestras empleadas, la asociación de las variantes con un determinado rasgo o una patología representan menos del 25% de la heredabilidad.

Esto pudiera deberse a que la mayoría de las variaciones hereditarias presentan bajas frecuencias o efecto pequeño, los cuales no pueden ser detectados con las tecnologías actuales y no permiten realizar una asociación directa con una rasgo o patología.

A pesar de ello, muchos de los conocimientos obtenidos en este campo han sido a través de estudios de asociación genoma completo GWAS (por sus siglas en inglés, *Genome Wide Association Studies*). Esta estrategia metodológica tiene como objetivo detectar variantes en loci genómicos que están asociados con rasgos complejos en la población y, en particular, detectar asociaciones entre polimorfismos comunes de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*) o también llamados variantes de un solo nucleótido SNV (*Single Nucleotide Variant*). Hasta el momento, de los miles de millones de variantes identificados en diversas poblaciones humanas, solo algunos miles han sido asociados a riesgo, desarrollo o progresión de complicaciones e inclusive protección contra diversas patologías como enfermedades cardíacas, diabetes, enfermedades autoinmunes y trastornos psiquiátricos.

El ser humano presenta gran variabilidad en características como altura, peso, carácter o apariencia física. Desde el punto de vista clínico se ha observado que cada paciente diagnosticado con la misma enfermedad responde de diferente manera al mismo tratamiento debido a la compleja combinación de los diferentes factores genéticos y ambientales a los que está expuesto. El desarrollo de las tecnologías modernas de secuenciación de última generación, así como del avance de la bioinformática y la genómica computacional, han permitido analizar y relacionar esta variabilidad biológica a diferentes escalas, lo que permite conocer los antecedentes genéticos y el estado clínico de cada paciente, su predisposición a diversas enfermedades, así como a los medicamentos.

Se han diseñado muchas herramientas de genómica estadística, con el objetivo de asociar la diversidad de fenotipos a los factores genéticos. Las dos fuerzas principales que aumentan la diversidad genética en los humanos son la mutación y la recombinación. Otras fuerzas adicionales, tales como la deriva genética y la selección natural, gobiernan el destino de la variación genética existente en las poblaciones naturales. En conjunto, todos ellos configuran el grado de variabilidad fenotípica presente a través de todos los miembros de la especie humana. Se pueden distinguir dos clases principales de variación genética en nuestros genomas según su tamaño: mutaciones puntuales y variación estructurales. Las mutaciones puntuales, ya comentadas previamente, son sustituciones de una sola base, por lo que se conocen como variantes simples. Los SNP son la clase más pequeña de polimorfismo en

términos del número de nucleótidos afectados y constituyen el más frecuente cambio en los genomas humanos. Por ejemplo, de los más de diez millones de SNP depositados en el repositorio público dbSNP, versión 155 disponible a partir de junio de 2021, solo se encuentran disponibles más de mil millones de variantes de referencia (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary.cgi). Dado los pocos genes presentes en el genoma humano que son alrededor de 19 000 y representan el 3% del genoma, la mayoría de los SNPs son “intergénicos” en lugar de “génicos”. Esa característica, sin embargo, no excluye un efecto funcional, ya que los SNP intergénicos puede tener funciones reguladoras. El otro tipo de variación, la variación estructural, incluye desde pequeñas inserciones/deleciones hasta grandes reordenamientos cromosómicos. Cada tipo de variante estructural tiene tasas distintivas de mutación y evolución, y su papel en la variación fenotípica humana ha sido abundantemente confirmado.

La recombinación constituye la segunda fuerza evolutiva más importante que aumenta variabilidad genética, ya que coloca variantes en el mismo cromosoma por recombinación de alelos. Las tasas de recombinación varían a lo largo del genoma, y se pueden distinguir “puntos calientes” de 1 a 2 kilobases de longitud con tasas aumentadas de más de cien veces. La recombinación tiene un fuerte impacto en el desequilibrio del ligamiento, que se refiere a la correlación entre los alelos ubicados en diferentes posiciones genómicas. Este fenómeno biológico está directamente relacionado con la noción de haplotipo, se define como las combinaciones de variantes a lo largo del mismo cromosoma que se heredan juntos a través de gametos. En una población, el desequilibrio del ligamiento ocurre cuando algunas combinaciones de los alelos se encuentran como haplotipos con más frecuencia de lo esperado por casualidad. La causa principal de desequilibrio del ligamiento es la aparición de nuevos alelos a través de mutaciones. Por el contrario, la reorganización de los haplotipos por recombinación los reduce. Uno de los estadísticos más utilizados para medir el desequilibrio por ligamiento entre pares de loci es r^2 ; eso es, la correlación estadística de alelos en pares de SNP. Esta medida es muy relevante para determinar etiquetas que cubren mejor la variación genética dentro de los bloques de desequilibrio del ligamiento.

Por su parte, la deriva genética, la selección natural y los procesos migratorios dan forma a la diversidad genética. Para los humanos, nuestros orígenes en

África y la dispersión son los principales determinantes de la distribución de la variabilidad entre poblaciones y de los patrones de desequilibrio del ligamiento entre variantes genómicas.

En los últimos 40 años, la disponibilidad de tecnologías como la secuenciación de última generación han permitido contar con secuencias de ácidos nucleicos completos y poder describir de manera precisa las variaciones genéticas en el genoma humano.

En general, las poblaciones africanas presentan mayor diversidad genética que las poblaciones que salieron de África. Sin embargo, la explosiva expansión del tamaño de las poblaciones humanas ha resultado en que la gran mayoría de las variantes se siguen considerando raras o como polimorfismos poco comunes con frecuencias alélicas menores 0.05. Debido a su aparición tardía en los últimos tiempos, las variantes raras tienden a ser confinadas a poblaciones continentales. Por el contrario, la mayoría de las variantes comunes son anteriores a la expansión humana a través de las principales migraciones de grupos humanos y son compartidas entre poblaciones.

La epidemiología generalmente se define como el estudio de la ocurrencia y los determinantes de fenotipos en una población. Más allá de su enfoque tradicional en manifestación de la enfermedad, las técnicas epidemiológicas se pueden utilizar para estudiar cualquier rasgo antropométrico, como la altura o el color del cabello. Por lo general, la causalidad es multifactorial y variable entre los individuos. Un paso clave en cualquier estudio epidemiológico es la definición de la población objetivo, el grupo de individuos de los que se pueden extraer conclusiones sobre los fenotipos, generalmente enfermedades.

En epidemiología se utilizan dos diseños básicos de estudio: de cohortes y de casos y controles. Los individuos de una cohorte están inicialmente libres de enfermedad y se determina debido a una característica compartida o exposición al riesgo. Estos individuos son seguidos durante un periodo de tiempo, y se puede dibujar la estimación puntual del riesgo relativo. Específicamente, el riesgo relativo mide la razón de probabilidad de enfermedad en personas expuestas personas más que en las personas que no están expuestas. Aunque el estándar de oro en el campo son los estudios de cohorte, son costosos y toman mucho tiempo porque solo una fracción de los individuos terminan desarrollando la enfermedad en estudio. El estudio de casos y controles es una alternativa

inmediata en la que los individuos con un fenotipo binario de interés de nuevo, generalmente el estado de la enfermedad, se identifican y sus exposiciones sospechosas se comparan con los de los controles. Idealmente, los individuos del grupo control deben ser imparciales representantes de la misma población. A partir de una tabla de contingencia, la asociación de exposiciones y el estado de casos y controles se mide por medio de la razón de posibilidades, la relación entre las probabilidades de exposición en los casos y las probabilidades de exposición en los controles. La epidemiología en el diseño de estudios de asociación genómica se centra en el estudio del papel de la genética, así como de factores ambientales. Su enfoque principal es variación heredada y comparaciones entre individuos. Dentro de la epidemiología genética, el enfoque se basa en estudiar si alguna enfermedad dada “se da en familias” y comprender el papel de la genética en sus patrones de herencia. Junto con los estudios de cohortes y casos y controles, los diseños basados en la familia son las piedras angulares del campo. En general, el proceso de la epidemiología genética se puede considerar como una tarea paso a paso cuyo objetivo final es desentrañar la arquitectura genética de rasgos complejos. Eventualmente, la descripción completa de la arquitectura genética de cualquier fenotipo dado consiste en el mapeo de todas las variantes genéticas asociadas a él y la determinación de las variantes causales que marcaban los marcadores asociados, junto con sus tamaños de efecto e interacciones con otros factores genéticos y ambientales.

La tendencia actual es relacionar que el riesgo genético de enfermedades comunes se debe a variaciones en el genoma con relativamente altas frecuencias alélicas. La forma más sencilla y completa de demostrar esta hipótesis es examinar todas las variaciones de ADN, especialmente los SNP en el genoma, y este enfoque del diseño de GWAS. Hoy en día, los estudios de GWAS se han convertido en una de las herramientas más poderosas para comprender los aspectos genéticos de la diversidad de enfermedades humanas. Sin embargo, su potencia y utilidad práctica no se demostró hasta 2002, cuando el equipo en RIKEN, un importante instituto de investigación de Ciencias Naturales en Wako, a las afueras de Tokio, Japón, reportaron por primera vez la identificación de variantes genéticas funcionales a través GWAS asociadas con el infarto de miocardio. Este primer éxito cambió por completo la corriente principal de estudio para identificar variantes asociadas a enfermedades de mayor incidencia y de alto impacto.

El posterior desarrollo de las metodologías y los avances técnicos en la búsqueda de esta variabilidad en nuestro genoma han permitido diseccionar sistemáticamente su base genética y llevado a la identificación de miles de diferentes polimorfismos asociados de forma reproducible con cientos de rasgos cuantitativos, incluida la susceptibilidad a una amplia variedad de patologías, tanto raras y poco comunes hasta enfermedades complejas multifactoriales, muy frecuentes y de gran importancia en salud pública como la obesidad o la diabetes.

Estos importantes avances fueron indispensables para consolidar los esfuerzos al comienzo del año 2000 para consolidar los primeros programas de secuenciación del genoma humano. Estas primeras bases de datos contenían considerables “ruidos” que no se podían encontrar en el mundo real. La razón fue muy simple: teniendo en cuenta la complejidad y se descubrió el significado de las variaciones en el genoma que están fuera de regiones asociadas a genes, debería ser mucho más fácil interpretar los vínculos entre variaciones genéticas y fenotipos. Como primer paso hacia la medicina personalizada que utiliza información genética de forma práctica y con potencial aplicación clínica, se identificaron 190 562 variantes genéticas en el genoma humano en población japonesa y en cohortes representativas de grupos multiétnicos (International HapMap Consortium, 2005).

En relación con esto, se han desarrollado diferentes proyectos a nivel mundial con el objetivo de identificar y registrar las diversas variaciones presentes en el genoma humano.

El Proyecto Internacional HapMap comenzó en 2001 y su objetivo es producir un catálogo de variaciones genéticas humanas comunes y su posición en el genoma. Este gran avance permitió desarrollar una base de datos de referencia que fortaleció la infraestructura para el posterior desarrollo de GWAS. Este proyecto se basó en dos hallazgos previos importantes. El primero, los antecedentes genéticos parecen ser diferentes entre etnias, por lo tanto, la frecuencia alélica de algunos loci podría ser diferente, lo que podría causar la estratificación de la población de la muestra. Esto planteó la necesidad de conocer la información genética de individuos ordinarios de cada etnia para servir como sujetos de control. El segundo hallazgo es el fenómeno de desequilibrio de ligamiento. En el genoma, el entrecruzamiento de cromosomas durante la meiosis no ocurre en ningún punto

al azar sino más bien se acumulan en loci específicos, llamados puntos críticos de recombinación. De esta manera, la tasa de recombinación no es plana en todo el genoma, sino que tiene una forma aguda similar a una espiga en los loci. Generalmente, la región rodeada por los dos picos está en la zona de desequilibrio de ligamiento. Dentro de la zona de desequilibrio de ligamiento, los loci con SNP a veces están completamente vinculados con otro SNP en el mismo lugar. Este fenómeno permitió a los investigadores realizar GWAS mucho más eficientes porque no necesitan examinar cada uno de los dos loci que están en el bloque, solo uno de los dos es suficiente. Los logros fueron publicados en *Nature* en 2005, donde el grupo japonés hizo la mayor contribución entre nueve institutos de genotipado en el mundo en ese momento, genotipando 269 muestras de ADN de cuatro poblaciones para 1000000 SNP en todo el genoma y encontrando de 250000 a 500000 loci SNP, suficientes para estudiar las variaciones del genoma completo, dependiendo de las poblaciones. El rápido progreso en la tecnología de genotipado empleando microarreglos de ADN aceleró el desarrollo para GWAS, y ahora hay más de 58 974 resultados de estudios disponibles solo en la base de datos Medline empleando el motor de búsqueda Pubmed y la creación de repositorios especializados.

Algunas de las evidentes ventajas de los microarreglos comparándose con WSG es que son relativamente más económicos (~40 dólares por muestra vs. > 1000 dólares por muestra), son más confiables y altamente precisos, su cobertura genómica principalmente está restringida a variantes comunes y de relativamente frecuencia, mientras que WGS es más útil para imputación de variantes raras y es cada vez más precisa para identificar variantes ultra raras; los microarreglos tienen sesgos importantes hacia variantes descubiertas en regiones genómicas bien estudiadas o poblaciones secuenciadas de baja frecuencia, mientras que WGS se enfoca a variantes comunes a casi toda la variación genética en el genoma, dependiendo de la profundidad de secuenciación; los análisis GWAS y sus herramientas bioinformáticas se encuentran bien establecidas para análisis de los datos, mientras que WGS tiene mayores costos computacionales y mayor complejidad analítica; eventualmente, pruebas múltiples más grandes carga al realizar una sola variante.

Otras consideraciones a tener en cuenta es que las matrices de genotipado personalizadas pueden ser extremadamente económicas, determinando en una sola corrida toda variación de múltiples individuos, con un mapeo fino más fácil.

Por otro lado, cuando se usa WGS se tienen mayores costos de almacenamiento, procesamiento y solo se usan generalmente para detectar variantes de baja frecuencia con asociaciones en tamaños de muestra extremadamente grandes, tomando en cuenta el diseño de análisis estadístico basado en metaanálisis.

En los últimos años, el lenguaje *R* se ha convertido en un factor importante en el lenguaje de programación elegido por los estadísticos y es también el entorno genérico más utilizado para el análisis de datos genómicos de alto rendimiento. La fuerza central de *R* radica en los literalmente miles de paquetes disponibles gratuitamente en repositorios como CRAN (<https://cran.r-project.org/>) y Bioconductor (<https://www.bioconductor.org/>), donde se almacenan librerías independientes del programa principal y se puede descargar desde repositorios centrales o, con menos frecuencia, directamente desde los desarrolladores. Existe una buena posibilidad de que para cualquier tarea dada haya ya una cuenta con un paquete que puede hacer el trabajo en cuestión, lo que ahorrará horas o días de programarlo usted mismo. Para los estudios de asociación del genoma completo hay cientos de paquetes disponibles para los diversos análisis. Hay paquetes para importar una amplia gama de formatos de datos, datos de preprocesamiento, para realizar pruebas de control de calidad, para ejecutar el análisis en sí y su integración posterior con bases de datos biológicas.

El uso de bases de datos relacionales que almacena y proporciona acceso a información relacionada entre sí para administrar conjuntos de datos SNP es una técnica muy útil que tiene ventajas significativas sobre métodos alternativos, incluida la capacidad de aprovechar el poder de este tipo de bases de datos para realizar validación y el uso del poderoso lenguaje de consultas SQL para exportar datos. SNPPy es un programa de Python que utiliza la base de datos PostgreSQL y la biblioteca SQLAlchemy Python para automatizar la gestión de datos SNP.

Los problemas de control de calidad para los métodos de genotipado basados en SNP utilizados en estudios de asociación del genoma completo son frecuentes. Las principales métricas para evaluar la calidad de los genotipos solucionan los procesos de control de calidad que comienza con datos sin procesar y termina con un filtrado completo del conjunto de datos listo para el análisis posterior. El énfasis está en la automatización del almacenamiento de datos, filtrado y manipulación para garantizar la integridad de los datos, el rendimiento del proceso y cómo extraer un resumen global de estos conjuntos

de datos de alta dimensión para permitir decisiones analíticas posteriores mejor informadas, utilizando el lenguaje de programación estadístico R o tuberías de control de calidad automatizadas con licencias comerciales de los proveedores de tecnología de secuenciación.

Por lo que respecta a los métodos estadísticos para estudios de asociación del genoma completo, ya sea en animales, plantas o humanos, la forma más simple es un análisis de marcador por marcador, aunque el problema es seleccionar un umbral de significancia que dé cuenta de la gran cantidad de análisis de las múltiples pruebas que se realizan en GWAS. La estructura de la población provoca asociaciones de falsos positivos que no se tiene en cuenta, y se presentan métodos para tratar esto. Metodologías para estudios más complejos como modelos para GWAS, incluidos los enfoques basados en haplotipos, que representan idénticos por descendencia versus idénticos por estado, y el ajuste simultáneo de todos los marcadores. Dentro de los métodos para el análisis estadístico de datos para GWAS tienen como objetivo común cuantificar evidencia de efectos genómicos asociados con la variación de rasgos, donde el análisis y la imputación de un solo marcador y el análisis bayesiano multilocus usando el paquete BayesQTLBIC en R son estrategias frecuentemente utilizadas. El análisis multilocus, aplicado en un análisis genómico, permite la inferencia local de la arquitectura genética QTL y es una alternativa a la imputación. Multilocus, incluido el cálculo de probabilidades posteriores para modelos alternativos, probabilidades posteriores para el número de QTL, probabilidades marginales para marcadores y factores de Bayes para cromosomas individuales son otras estrategias.

Otra estrategia de trabajo ampliamente utilizada es la PLINK (<https://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>) desarrollado por Shaun Purcell en el Centro de Investigación Genética Humana (CHGR), el Hospital General de Massachusetts (MGH) y el Instituto Broad de Harvard y el MIT, con el apoyo de otros muchos colaboradores. PLINK es un conjunto de herramientas de análisis de asociación del genoma completo gratuito y de código abierto, diseñado para realizar una variedad de análisis básicos a gran escala de manera computacionalmente eficiente. El enfoque de PLINK es puramente en el análisis de datos de genotipo/fenotipo, por lo que no hay soporte para pasos anteriores a esto (por ejemplo, diseño y planificación del estudio, generación de llamadas de genotipo o CNV a partir de datos sin procesar). PLINK permite leer datos, la gestión de datos,

aplicar control de calidad, evaluación de la subestructura de la población y ejecutar análisis de asociación de rasgos cuantitativos y análisis cualitativos y/o análisis de asociación de casos y controles.

La estimación de la variación genética se realiza tradicionalmente mediante el análisis de pedigrí. El empleo de alto rendimiento para el análisis de datos de marcadores de ADN medidos en todo el genoma ahora es posible estimar y dividir la variación genética de las muestras de población. La herramienta de software llamada análisis de rasgos complejos de todo el genoma (GCTA, por sus siglas en inglés) estima las relaciones genómicas entre pares de individuos no relacionados que utilizan datos de polimorfismo de nucleótido único en todo su genoma, para estimar la variación explicada por todos los SNP simultáneamente en segmentos genómicos o cromosómicos, y para realizar un análisis de asociación de múltiples SNP conjuntos y condicionales, utilizando estadísticas de resumen de un metaanálisis de estudios de asociación de todo el genoma y desequilibrio de ligamiento entre los SNPs estimados de una muestra de referencia.

Los métodos bayesianos de regresión múltiple también se están utilizando con éxito para la predicción y selección genómica. Estos modelos de regresión ajustan simultáneamente muchos más marcadores que el número de observaciones disponibles para el análisis, por lo tanto, el teorema de Bayes se usa para combinar creencias previas de efectos de marcador, que se expresan en términos de distribuciones previas, con información de datos para inferencia. A menudo, los análisis son demasiado complejos para soluciones de forma cerrada y el muestreo, empleando métodos de Montecarlo basados en cadenas de Markov, que se utilizan para estimar inferencias estadísticas de distribuciones posteriores, donde la ventaja de este enfoque es que el poder de detectar asociaciones que no son inversamente relacionadas con el número de marcadores.

El paquete BLR (regresión lineal bayesiana) de R implementa varios modelos de regresión bayesiana para rasgos continuos. El paquete se desarrolló originalmente para implementar el Bayesian LASSO (BL) de Park y Casella (2008), ampliado para incluir efectos fijos y regresiones sobre pedigrí usando métodos descritos por de los Campos *et al.* en 2008. En 2010 se desarrolló aún más el código en un paquete R, reprogramando algunos aspectos internos del algoritmo en el lenguaje C para aumentar la velocidad computacional, y

documentó aún más el paquete. La primera versión de BLR se lanzó en 2010 y desde entonces el paquete se ha utilizado para múltiples publicaciones y se utiliza de forma rutinaria.

La validación de los resultados de los estudios son componentes fundamentales para la experimentación derivada de investigación científica. Esta validación permite a los usuarios cuantificar el beneficio de aplicar pruebas genéticas o predicción genómica, en relación con los costos de implementación del programa. Además, si se implementa, un peso apropiado en un índice de selección solo se puede derivar si las estimaciones de la precisión de la genómica y las predicciones están disponibles, dado que los estudios de asociación del genoma completo han revelado miles de loci genéticos que sustentan la compleja biología de muchos rasgos humanos. Sin embargo, la fuerza de GWAS, la capacidad de detectar asociación genética por desequilibrio de ligamiento es también su limitación. Si bien el tamaño cada vez mayor del estudio y el diseño mejorado han aumentado el poder de GWAS para detectar efectos, diferenciación de variantes causales o genes de otros genes altamente correlacionados asociados con desequilibrio de ligamiento sigue siendo el verdadero desafío. Esto obstaculizó severamente los conocimientos biológicos y la traducción clínica de los hallazgos de GWAS. Aunque se han informado miles de loci de susceptibilidad a enfermedades, los genes causales en estos loci siguen siendo esquivos. Las técnicas de inteligencia artificial basadas en aprendizaje automático ofrecen una oportunidad para diseccionar la heterogeneidad de las señales variantes y genéticas en el análisis posterior a GWAS. Los modelos de aprendizaje basado en máquinas para la priorización de GWAS varían mucho en su complejidad, desde enfoques de regresión logística relativamente simples para modelos de conjuntos más complejos como bosques aleatorios y aumento de gradiente, así como modelos de aprendizaje profundo basados en redes neurales. Junto con la validación funcional, estos métodos muestran una promesa importante para traducción clínica, proporcionando un sólido enfoque basado en la evidencia para dirigir investigación post-GWAS.

FIGURA 1. EVOLUCIÓN DE LOS ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN MEDIANTE GENÓMICA COMPARATIVA



Referencias

- Auer, P. L. y Lettre, G. (2015). Rare variant association studies: Considerations, challenges and opportunities. *Genome Medicine*, 7(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0138-2>
- Frazer, K. A., Murray, S. S., Schork, N. J. y Topol, E. J. (2009). Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nature Reviews Genetics*, 10(4), 241-251. <https://doi.org/10.1038/nrg2554>

- International HapMap Consortium (2005). A haplotype map of the human genome. *Nature*, 437(7063), 1299-1320. <https://doi.org/10.1038/nature04226>
- Keinan, A. y Clark, A. G. (2012). Recent Explosive Human Population Growth Has Resulted in an Excess of Rare Genetic Variants. *Science*, 336(6082), 740-743. <https://doi.org/10.1126/science.1217283>
- Krier, J., Barfield, R., Green, R. C. y Kraft, P. (2016). Reclassification of genetic-based risk predictions as GWAS data accumulate. *Genome Medicine*, 8(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0272-5>
- Liao, K., Carlson, J. y Zöllner, S. (2023). The effect of mutation subtypes on the allele frequency spectrum and population genetics inference. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 13(4), jkado35. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkado35>
- Manolio, T. A. (2010). Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. *New England Journal of Medicine*, 363(2), 166-176. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0905980>

Medicina genómica en obesidad

José María Vera Cruz

Itzae Adonai Gutiérrez Hurtado

José Villanueva Torres

Obesidad

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que perjudica la salud. Este problema ha crecido significativamente en todo el mundo a lo largo de los años, y afecta no solo a los adultos, sino también a jóvenes y niños, con serias repercusiones para la salud. Según la Secretaría de Salud de Jalisco, el 27.7% de la población infantil entre 5 y 11 años presenta sobrepeso, mientras que el 35% de los adolescentes de entre 12 y 19 años también se ven afectados. En la actualidad, la OMS reporta que México ocupa el primer lugar mundial en obesidad en obesidad infantil y el segundo lugar en obesidad en adultos, solo superado por Estados Unidos.

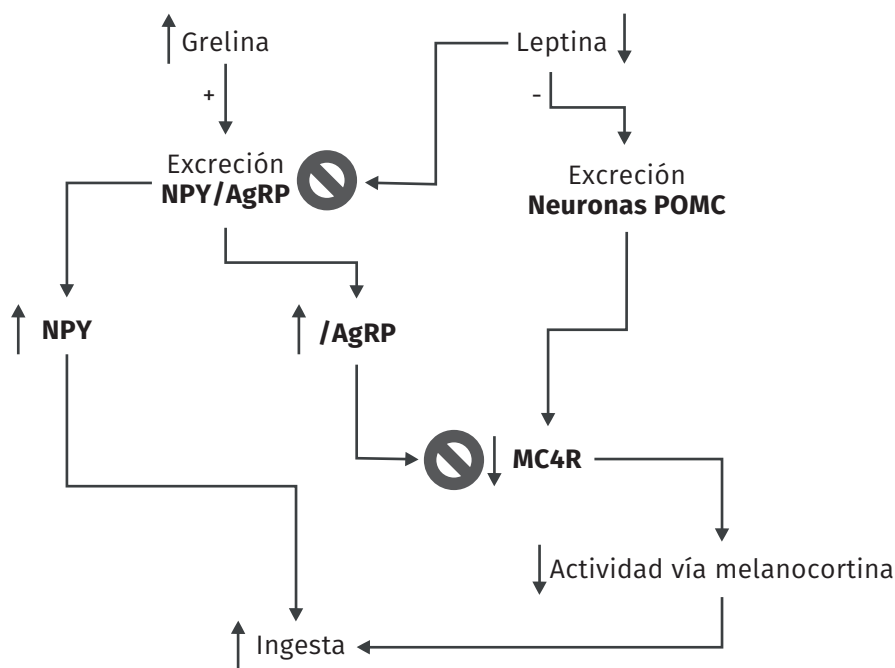
En México en el año 2022, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (Ensanut) reportó que zonas urbanas el porcentaje de obesidad en mujeres es del 23.1% y de 15.5% en hombres. Se predice que la obesidad infantil y adolescente tendrá un incremento del 2.5% anual para 2030.

Estas cifras indudablemente representan un grave problema de salud, si tomamos en cuenta que las personas obesas muestran una disminución considerable en el periodo de vida, ya que tienden a desarrollar comorbilidades, como enfermedades cardiovasculares, hipertensión, diabetes tipo II, dislipidemias, cáncer, entre otras. La ingesta de alimentos es controlada por

el neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado a agouti (AgRP), esta última también conocida como hormona estimulante de los alfa melanocitos. Estas dos moléculas son controladas por la leptina, insulina grelina polipéptido YY (PYY), glucocorticoides, adrenocorticoides, los sistemas serotoninérgicos, dopaminérgica, adrenérgico, GABAérgico y por último la hormona liberadora de corticotrofina.

El ayuno, la diabetes no controlada y la deficiencia genética de leptina son ejemplos de condiciones en las que la ingesta de alimentos aumenta a través de un mecanismo que se supone involucra a NPY/AgRP.

FIGURA 1. CONTROL DE INGESTA DE ALIMENTO, QUE IMPLICA A LA GRELINA Y LA LEPTINA



Existen innumerables reportes de la asociación existente entre la obesidad y algunas variantes genéticas, lo cuales establecen que entre el 65-85% de los casos de obesidad se deben a la carga genética de los pacientes. En base a las alteraciones genéticas, la obesidad se ha clasificado en obesidad monogénica y obesidad poligénica.

Obesidad monogénica (OM)

La OM es una forma rara de obesidad causada por variantes en genes implicados en el control de apetito y regulación del gasto energético; este tipo de obesidad es una forma severa y poco frecuente. Se han determinado pocos casos durante la niñez, pero los casos observados han presentado trastornos neuroendocrinos.

La mayoría de los genes implicados al desarrollo de la OM están relacionados con el sistema leptina-melanocortinas. Los factores genéticos juegan un papel significativo en el desarrollo de este tipo de obesidad, contribuyendo entre 40% y 70% del riesgo. Varios genes, como el de la leptina, el receptor de leptina, la pro-hormona convertasa 1, la proopiomelanocortina, el receptor de melanocortina 4, el homólogo de single-minded 1, el factor neurotrófico derivado del cerebro y el receptor de tirosina quinasa tipo 2, son conocidos por causar OM. Existen intervenciones terapéuticas novedosas para algunas formas de OM, siendo las variantes en el gen MC4R la causa más común de obesidad de inicio temprano en algunas poblaciones. Tratamientos específicos están disponibles solo para ciertos tipos de OM, como la deficiencia de leptina.

La primera variante de la OM es la obesidad sindrómica, la cual se puede presentar por alteraciones cromosómicas y se caracteriza por presentar retraso mental, entre las cuales observamos:

- ♦ Síndrome de Prader-Willi: es un trastorno genético complejo que afecta múltiples sistemas del cuerpo. Es causado por la pérdida de función de genes en una región específica del cromosoma 15 paterno. Los factores que contribuyen a la obesidad en el síndrome de Prader-Willi incluyen anomalías en los péptidos gastrointestinales, como la grelina, y disfunciones del sistema nervioso autónomo.
- ♦ Síndrome de Cohen: es causado por mutaciones en el gen VPS13B (también conocido como COH1). Este gen proporciona instrucciones para fabricar una proteína que juega un papel crucial en la función y la estructura celular. Se caracteriza por una variedad de síntomas que afectan el desarrollo físico y mental; la obesidad suele ocurrir después de los 5 años de edad y es una característica notable del síndrome de Cohen.

- ◇ Síndrome de Bardet-Biedl: cursa graves problemas oculares, entre los que se observa distrofia en la retina del paciente que pueden llevar a la pérdida total de vista. La causa no se ha establecido correctamente, pero se conocen 8 loci involucrados.

La segunda variante de la OM es la obesidad poligénica no sindrómica. Solo el 5% de los casos de OM desarrollan este tipo de obesidad. Esta enfermedad es causada por la comprensión de la herencia de la obesidad mendeliana, la cual se presenta por mutaciones que alteran y/o modifican la vía de la leptina-melanocortina.

Obesidad poligénica

La obesidad poligénica es mucho más frecuente y puede estar asociada a aproximadamente 200 variantes génicas o polimorfismos. Estos polimorfismos pueden estar presentes en diferentes regiones del DNA en genes que regulan el peso corporal. Entre los genes asociados a la obesidad poligénica se encuentran los responsables de mandar las señales de hambre y de saciedad, los que participan en el crecimiento y diferenciación de los adipocitos, así como los encargados de controlar el gasto calórico.

Obesidad mórbida

La obesidad mórbida, según los National Institutes of Health (Institutos Nacionales de Salud) de Estados Unidos, se define como un sobrepeso de 50% al 100% encima del peso corporal ideal, o 45 kg sobre el peso corporal ideal. Es representada por un IMC mayor a 40 mg/m² y es una de las causas observadas que se ha presentado en la población de Jalisco, ya sea en adultos mayores, jóvenes e infantes.

Como la obesidad es considerada un grave problema de salud pública, los estudios actuales se enfocan en comprender cómo actúan los genes LEP, LEPR y MC4R que participan en el sistema leptina-melanocortina, el cual opera en la regulación neuroendocrina de la ingestión y el equilibrio energético e influye en la patogenia de la enfermedad.

La mutación del gen *Mc4R* es considerado la principal causa hasta 4 % de los casos con obesidad mórbida. Es una mutación autosómica dominante que causa una obesidad común, ya que no se asocia con disfunción hipofisaria. Los genes *SIM1*, *BDNF* y *NTRK2* se han descrito en estos últimos cinco años, que están estrechamente relacionados con el desarrollo de la obesidad

Papel de la leptina (LEP) y su receptor (LEPR) en la obesidad

La leptina, conocida también como proteína PN, es una adipocina secretada no de manera exclusiva por los adipocitos, ya que se ha observado que el hipotálamo, el ovario y la placenta lo secretan en cantidades menores. La placenta incrementa su producción durante el embarazo y en los osteoblastos está implicado en el metabolismo óseo.

La leptina es codificada en el gen *lep*, que se encuentra en el cromosoma 7 y se le conoce como la hormona de la saciedad. En sujetos con obesidad y/o sobrepeso, se incrementa la expresión de leptina con la finalidad de disminuir el apetito e incrementar el consumo de energía a partir del sistema termogénico de las células, el cual está controlado por el hipotálamo.

En el año de 1994, Zhang y Friedman identificaron el gen que codifica para leptina, así como la mutación que permita se desarrolle la obesidad y la hiperfagia. La mutación consiste en una sustitución de citosina por timina, que genera un codón de terminación en el aminoácido 105 que en sujetos sanos es arginina. Esta mutación genera obesidad severa junto con defectos termogénicos y la activación de la lipólisis.

Receptor de leptina “LEPR”

El receptor de leptina se encuentra en el hipotálamo, es una proteína de membrana homologa al receptor de las citocinas del tipo 1 (receptores transmembranales que responden a citocinas con cuatro cadenas helicoidales α). Estos receptores se encuentran ligados a la familia de las janus cinasas (Jak), que pertenecen a la familia de las tirosin-cinasas. La unión del ligando activa a la cinasa Jak y promueve la fosforilación de varias proteínas citoplasmáticas. Los factores transcripcionales presentes en este proceso son: STAT3 como principal y SOCS3 y PTP1B, los cuales finalizan el proceso de señalización.

La leptina y su receptor son expresados en los estados inflamatorios que se observan en las personas con obesidad y esto predispone a que el paciente pueda desarrollar diabetes, problemas cardiovasculares, síndrome metabólico y enfermedades alérgicas. Pacientes deficientes o carentes del LEPR pueden desarrollar hiperfagia, obesidad, resistencia a insulina y a leptina. Pero cuando la deficiencia se presenta antes de los seis meses de vida, el paciente puede desarrollar hipogonadismo y otras deficiencias hormonales adenohipofisarias.

Vía de señalización de la leptina

La leptina actúa por medio de la vía de señalización JAK2/STAT3, sin embargo, el receptor del gen de la obesidad (obR) vía JAK2 y Grb2 pueden activar otras vías, como ERK, Akt, IRS-1, AP-1 (proteína activadora de la transcripción 1) y SOCS3 son los que regulan la actividad de la leptina en las células. Otra vía alternativa de señalización de la leptina es la de fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K), la cual provoca que se fosforilen los residuos de la tirosina en el receptor insulínico (IRS2) vía JAK2 que fosforila a PI3K25 para activarla.

El *sistema melanocortinas* está compuesto por la proopiomelanocortina (POMC) y péptidos obtenidos a partir de POMC, los cuales actúan como sitios de unión de los receptores de *melanocortinas* y los de la hormona *adrenocorticotropa* (ACTH).

Receptor de melanocortina 4 (MC4R)

El receptor de melanocortina 4 (MC4R) es uno de los elementos más importantes en la vía de señalización de la melanocortina. Perteneciente a la familia de los GPCR que se expresan en cerebro, hipotálamo, músculos, astrositos y adipocitos. Es el receptor que se acopla a la proteína G, la cual participa en la señalización leptina- melanocortina. La activación de este gen tiene un papel muy importante en la homeostasis calórica, se relaciona con la disminución del consumo de alimentos, en la tolerancia a los medicamentos, en eventos antiinflamatorios y en el comportamiento sexual. Este gen está implicado en pacientes con obesidad monogénica y niños que tengan esta alteración sienten muchas ganas de comer lo que va a provocar una alta predisposición a

desarrollar obesidad (hiperfagia). Estudios realizados con GWAS demostraron que los SNPs próximos a este gen tienen una alta participación en el incremento exacerbado de la obesidad en individuos a edad temprana.

La deficiencia de MC4R es una de las principales causas para desarrollar obesidad, principalmente en la obesidad monogénica no sindrómica. Se ha estimado que el 2.5% de los casos con obesidad a nivel mundial se deben a una mutación en el gen MC4R.

Gen POMC (pro-opiomelanocortina)

Es un gen que inhibe la ingesta de alimentos controlando así el peso corporal. Produce neuropéptidos y hormonas peptídicas, entre las que se encuentra hormona adrenocorticotrófica (ACTH) y la hormona estimulante de melanocitos (MSH) tanto α como β , los cuales se expresan en gran medida en la hipófisis. Se cree que una mutación del gen de POMC produciría un defecto en la función de MSH, provocando con esto el incremento de obesidad.

Cuando el gen POMC está defectuoso en niños obesos desde su nacimiento, estará relacionado con una deficiencia aguda de la corteza suprarrenal. En niños homocigotos y heterocigotos que presentan mutación en este gen, se les ha observado hipotiroidismo leve, cabello rojo, insuficiencia suprarrenal y piel pálida debido a la carencia de α -MSH.

Gen asociado a la masa grasa y la obesidad (FTO)

Es un gen de gran tamaño que lo conforman 9 exones y más de 400 kb. Se ha detectado en tejidos fetales. En cerebro e hipotálamo, este gen se expresa en cantidades altas y participa controlando la homeostasis calórica. Es un factor genético implicado recientemente con la obesidad y sus variantes genéticas están implicadas con el acúmulo excesivo de adipocitos (adiposidad), además se presenta en trastornos metabólicos y en pacientes con cáncer.

Estudios GWAS ponen al gen FTO como el gen más importante que favorece el desarrollo de la obesidad. Se ha demostrado que este gen está presente tanto en la población infantil como en la adulta y provoca con mayor facilidad el desarrollo a diabetes tipo II.

TABLA 1. GENES IMPLICADOS EN LA OBESIDAD

GEN	CROMOSOMA	NOMBRE DEL GEN	PAPEL EN LA ENFERMEDAD
LEP	7q31	Leptina	Se produce en los adipocitos
LEPR	1p31	Receptor de leptina	Se une a la leptina e inhibe el apetito
CRHR1	17q12	Receptor 1 de hormona liberadora de corticotropina	-----
CRHR2	7p14	Receptor 2 de hormona liberadora de corticotropina	-----
GPR24	22q13	Hormona concentradora de melanina	-----
PCSK1	5q15	Prohormona convertasa 1	Regula la síntesis de insulina
POMC	2p23	Proopiomelanocortina	Obesidad, insuficiencia suprarrenal, cabello rojo
MC3R	20q13	Receptor 3 de melanocortina	Obesidad
MC4R	18q22	Receptor 4 de melanocortina	Se une a la hormona estimulante de los melanocitos alfa y estimula las ganas de comer
NTRK2	9q22	Receptor del factor neurotrófico cerebral TrkB	Obesidad, hiperfagia, retraso en el desarrollo
SIM1	6q16	Homólogo 1 single-mind	Obesidad severa, trastorno neuroconductual
BDNF	11p4	Factor neurotrófico derivado del cerebro	Hiperfagia, obesidad severa, deterioro cognitivo, hiperactividad
FTO	6q12	Gen asociado a la grasa magra y a la obesidad	Provoca las ganas de ingerir alimentos
ADIPOQ		Dominio que posee adipocitos y colágeno	Provoca que la adiponectina favorezca el gasto energético
INSIG2		Gen inducido por la Insulina	Regula la síntesis de colesterol y/o ácidos grasos
PPARG		Es el receptor gama activado por el proliferador de peroxisomas	Estimula la captación de lípidos junto con el acúmulo de adipocitos

Insulina y obesidad

La insulina es una hormona producida por el páncreas, cuya función principal radica en la regulación de los niveles de glucosa en la sangre mediante su ingreso a la célula. Este proceso es esencial para el suministro de energía a los músculos, el almacenamiento hepático de glucógeno y la conversión de glucosa en lípidos en los tejidos adiposos. La insulina actúa como un mensajero molecular, activando una variedad de procesos metabólicos que mantienen la homeostasis de la glucosa en el organismo, incluida la translocación de los transportadores de glucosa GLUT, lo que aumenta la captación de glucosa por parte de las células en respuesta a la insulina. La insulina, mediante la activación de la vía de señalización de PI3 quinasa/AKT, permite la activación del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), que a su vez conduce a la fosforilación y activación de la proteína quinasa B (PKB o AKT), la cual regula una variedad de procesos celulares clave, incluida la supervivencia celular y la translocación de GLUT4 (transportador de glucosa) a la membrana plasmática celular. Este GLUT representa la vía de internalización de la glucosa al interior de la célula y permite la activación de la glucógeno sintasa e inhibe la gluconeogénesis. La vía inicia cuando PI3K fosforila los fosfolípidos de la membrana y convierte al inositol polifosfato 5-fosfatasa, también llamada fosfatidilinositol-5-bisfosfato (PIP2) en fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). La función de esta molécula está dirigida a activar mediante la fosforilación del fosfoinosítido dependientes de cinasa (PDK1 y PDK2), que conduce a la activación de la fosforilación de AKT/PKB y PKC (proteína cinasa C) para trasladar GLUT4 a la membrana plasmática desde el compartimento vesicular que se encuentra al interior de la célula.

Cuando una persona obesa presenta resistencia a la insulina, se debe principalmente a que la vía PI3K/AKT2/GLUT4 está funcionando por debajo de lo necesario o requerido. Pero en cambio, cuando una persona obesa presenta una actividad normal en la vía PI3K/AKT2/GLUT4, el metabolismo de este paciente obeso será normal hasta que el cuerpo no pueda amortiguar las variaciones de esta vía. Debido a lo anterior se sabe que la obesidad juega

un papel muy importante para que un paciente obeso pueda desarrollar resistencia a la insulina. Esto se observa cuando existe un incremento de los adipocitos, los cuales favorecen a la expresión de citocinas proinflamatorias y junto con los ácidos grasos juegan un papel central en el desarrollo de resistencia a la insulina en pacientes obesos.

Inflamación y obesidad (lipoinflamación)

La obesidad es una patología que cursa con un estado de inflamación crónica, la cual se caracteriza por un incremento de citoquinas proinflamatorias en sangre. Una de las citosinas más relevantes en este periodo de inflamación es el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$) junto con algunas proteínas reactantes de fase aguda, como lo es la proteína C reactiva.

TNF- α

$TNF-\alpha$ es considerada una de las principales adipocitocinas junto con interleucina-6 (IL-6), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1). Esta citocina es expresada por los adipocitos. $TNF-\alpha$ tiene relevancia en estudios sobre la respuesta inmune y el cáncer. Además, está implicada en el desarrollo y expresión fenotípica de la obesidad, por lo que se le considera como un factor adipostático el cual es inducido cuando se incrementa la masa corporal con la finalidad de limitar su progresión. También se sabe que el papel de $TNF-\alpha$ es clave en la resistencia a la insulina, debido a que puede controlar la actividad de la insulina en los adipocitos, utilizando a los inhibidores de la vía de señalización de esta hormona, Los pacientes puedan desarrollar resistencia a la insulina, debido a que puede favorecer a que presente hiperinsulinemia. La cantidad de $TNF-\alpha$ está relacionada con el grado de adiposidad y de resistencia a la insulina, por lo que se considerada a esta molécula junto con su receptor un excelente blanco terapéutico para tratar la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2.

Resistina

Es una adipocina rica en cisteínas, la cual es inducida durante la adipogénesis por los adipocitos. Algunos estudios han demostrado que la producción de resistina por los adipocitos es baja y que los macrófagos se consideran la principal fuente de resistina en sangre. Se sabe que esta molécula vincula la obesidad con la diabetes tipo II al modular la vía de señalización de la insulina e induce la resistencia a la insulina. Estudios han mostrado que cuando se suprime la expresión de la resistina, se incrementa la captación de glucosa estimulada por la insulina y se disminuye la resistencia a la insulina. La resistina participa en la secreción de TNF- α y varias interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12), las cuales se conocen que participan en el desarrollo del síndrome metabólico.

Se han propuesto tres funciones fisiológicas a la resistina:

1. Mediador de la regulación del metabolismo (altera la homeostasis de la glucosa)
2. Regulador de la adipogénesis
3. Se encuentra relacionado con la inflamación

Se ha observado que la resistina es de suma importancia en enfermedades metabólicas, inflamatorias y autoinmunes, y también se ha detectado en pacientes con alteraciones cardiovasculares por la presencia de los macrófagos implicados en la respuesta inflamatoria relacionada con la obesidad.

ABCA1

Es un receptor de absorción en los macrófagos, el cual tiene un papel importante en el movimiento de colesterol y fosfolípidos, en la biosíntesis de lipoproteínas de alta densidad (HDL), en el transporte inverso de colesterol, en el transporte de diversos sustratos (α -tocoferol, apo E, interleucina [IL]-1 β), en la translocación de fosfolípidos, absorción de células apoptóticas y en la regulación de la inflamación. Durante su regulación participan sistemas de receptores nucleares, factores que se unen a otros sitios en el promotor de ABCA1,

citocinas, hormonas, factores de crecimiento, metabolitos de lípidos, enzimas y otros mensajeros/factores/vías. Se han encontrado en este gen algunos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), los cuales se cree están involucrados con la disminución de los niveles de HDLC. Los transportadores del sistema ABC tienen una gran importancia en la aparición de diferentes enfermedades, entre la que encontramos Alzheimer (ABCA1 y ABCA7/ gpP), aterosclerosis (ABCA1 y ABCG1), enfermedades hepáticas (ABCB11 y ABCB4).

Adiponectina

Péptido secretado por los adipocitos que participan de manera importante en el desarrollo de enfermedades relacionadas con la obesidad, como la resistencia a la insulina, diabetes tipo II y enfermedades cardiovasculares. Existen otro tipo de células capaces de expresar adiponectinas, entre las que vemos a las células esqueléticas, miocitos y endoteliales. Esta molécula se cree que participa en el ensamblaje y secreción de complejos de adiponectina de orden superior. Algunos estudios han demostrado que la administración de adiponectina tiene efectos sensibilizantes a la insulina, antiaterogénicos, antiinflamatorios y, en ciertas condiciones, también disminuye el peso corporal. Por lo que la terapia con adiponectina, puede ayudar al tratamiento de la obesidad, la resistencia a la insulina/diabetes tipo 2 y la aterosclerosis. Las isoformas AdipoR1 y AdipoR2 son los receptores de la adiponectina.

Grelina (GHRL)

Hormona sintetizada por el estómago, el cual es un ligando natural del receptor de la hormona del crecimiento (GHSR). Su función está dirigida a estimular la hormona del crecimiento (GH) que se encuentra en la hipófisis, participa en la regulación neuroendocrina del metabolismo energético y es un indicador del estado nutricional para el sistema nervioso central.

GHR es un importante mediador que participa en la regulación del apetito, GHRL provoca las ganas de comer mientras que la leptina ejerce un efecto contrario, ya que inhibe las ganas de comer. Cualquier alteración y/o cambio en cualquiera de estas moléculas puede provocar trastornos o

enfermedades relacionados con la nutrición, entre las que observamos a la obesidad, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer.

Colecistoquinina (CCK)

Es perteneciente a las hormonas peptídicas y es secretada por el sistema gástrico, principalmente en duodeno, yeyuno e íleon proximal de las células enteroendocrinas. Este péptido tiene distintas funciones, entre las que observamos funciones reguladoras en intestino y cerebro. Este último tejido participa en el aprendizaje, memoria y saciedad.

CCK se relacionan con la obesidad porque induce saciedad y reduce la ingesta de alimentos, y se secreta a la sangre en cuantos los alimentos se absorben al sistema sanguíneo. CCK-1 es su receptor, el cual está presente en las fibras C sensibles a la capsaicina del duodeno, las cuales pueden transmitir la señal a la región del cerebro posterior (NTS) y en el estómago. Estos últimos receptores son los que provocan la inhibición en el vaciado gástrico. Entre las funciones de CCK está la de modular la función de varios órganos gástricos (páncreas, vesícula biliar e intestino) mediante sus receptores CCK-1. Un mal funcionamiento del CCK o de su receptor origina enfermedades como diabetes mellitus o cálculos biliares. CCK presenta propiedades similares a la gastrina.

Cómo funciona la CCK

La CCK que se encuentra en estómago, al activar a su receptor CCK-1 provoca su relajación estomacal y provoca la contracción del esfínter, lo cual provoca una reducción en la entrada de alimentos por el duodeno. Cuando activa a su CCK-1 de páncreas, logra estimular tanto endocrinamente como exocrinamente la secreción de insulina y la proliferación de células beta, lo que provoca una reducción de la hiperfagia dando sensación de saciedad. En cerebro, CCK activa a las células del núcleo del tracto solitario (NTS), lo que provoca saciedad en el paciente y reduce la sensación de hambre. También controla los efectos de la grelina y provoca en el hipotálamo el bloque de la síntesis de RNAm de la orexina y de la hormona concentradora de la mielina (MCH).

GWAS de obesidad

Estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han podido identificar algunos loci que se encuentran asociados al índice de masa corporal (IMC) y solo muy pocos se centraron en la obesidad como su principal rasgo o problema. Estos estudios han podido informar la relación entre los 2.1 millones de variantes genéticas comunes y el IMC en más de 300 000 personas. La asociación más fuerte se encontró en el locus de FTO (gen asociado a la masa grasa y a la obesidad). Este gen es uno de los más importantes que detectó GWAS para la diabetes mellitus tipo 2 (T2DM), el cual detectó que la asociación se debía al aumento de IMC en pacientes con diabetes tipo II, en comparación con los controles no diabéticos.

La obesidad se ha convertido en una epidemia global con implicaciones profundas para la salud pública. Esta condición aumenta el riesgo de una variedad de enfermedades crónicas, como la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. A nivel fisiopatológico, la obesidad está estrechamente relacionada con la inflamación crónica de bajo grado en el tejido adiposo. Los adipocitos no solo almacenan energía en forma de grasa, sino que también secretan una variedad de moléculas bioactivas, conocidas como adipocitoquinas. Entre estas adipocitoquinas se encuentran el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la resistina, que son dos de las principales proteínas proinflamatorias secretadas por el tejido adiposo. El TNF- α se ha implicado en la promoción de la inflamación crónica y la resistencia a la insulina en la obesidad, mientras que la resistina también se asocia con la resistencia a la insulina y la disfunción metabólica. Estas moléculas pueden contribuir a la aparición y progresión de la obesidad, así como a las complicaciones metabólicas asociadas, como la diabetes tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, se necesita más investigación para comprender completamente los roles específicos de estas adipocitoquinas y su contribución a la fisiopatología de la obesidad.

Es importante tener en cuenta que la obesidad no es una entidad homogénea; existen diferentes causas subyacentes que pueden clasificarse en varias categorías, incluyendo obesidad monogénica, síndromes asociados con obesidad (como el síndrome de Prader-Willi y el síndrome de Cohen) y obesidad multifactorial, influenciada por una interacción compleja entre factores genéticos, ambientales y de estilo de vida.

El control del apetito y el metabolismo energético está finamente regulado por una red compleja de hormonas y neurotransmisores. Hormonas como la leptina, producida por el tejido adiposo, y la grelina, secretada principalmente en el estómago, juegan un papel crucial en la regulación del apetito y la saciedad. Además, neurotransmisores como la serotonina, la dopamina y el péptido YY también están implicados en la modulación del comportamiento alimentario y la ingesta de alimentos.

Abordar el problema de la obesidad requiere un enfoque integral que incluya intervenciones a nivel individual, comunitario y político. Esto implica no solo la promoción de estilos de vida saludables, como una dieta equilibrada y la actividad física regular, sino también la comprensión y abordaje de los factores genéticos y ambientales que contribuyen a esta enfermedad multifacética.

Referencias

- Achari, A. E. y Jain, S. K. (2017). Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci*, 18, 1321. DOI: 10.3390/ijms18061321.
- Aguarone, Y., Monacelli, F., Borghi, R., Nencioni, A. y Odetti, P. (2019). Resistin: A reappraisal. *Mechanisms of Ageing and Development*, 178, 46-6. DOI: 10.1016/j.mad.2019.01.004.
- Espinoza, A. S., Martínez, A. G. y Reyes, Z. (2021). The role of ghrelin and leptin in feeding behavior: Genetic and molecular evidence. *Endocrinol Diabetes Nutr (Engl Ed)*, 68(9), 654-663. DOI: 10.1016/j.endien.2020.10.009.
- Gutiérrez, H., Mariscal, M., Almanzor, P. P., Ayala, Gama, V. y Lara, G. (2010). Capítulo 1: Sobre peso y obesidad. En *Diez problemas de la población de Jalisco: Una perspectiva sociodemográfica* (pp. 7-34). Secretaría de Salud.
- Kumar, R., Kumar, P. y Mahalingam, K. (2017). Molecular genetics of human obesity: A comprehensive review. *Comptes Rendus Biologies. CR biol*, 340(2), 87-108. DOI: 10.1016/j.crvi.2016.11.007.
- lindberg, I. y Fricker, L. D. (2021). Obesidad, POMC y enzimas de procesamiento de POMC: resultados sorprendentes de modelos animales. *Endocrinología*, 162(12), bqab155. DOI: 10.1210/endocr/bqab155.
- Martos-Moreno, G. A., Serra-Juhé, C., Pérez-Jurado, L. A. y Argente, J. (2017). Aspectos genéticos de la obesidad. *Rev Esp Endocrinol Pediatr*; 8(Suppl), 21-32.

- Morton, G. J. y Schwartz, M. W. (2001). The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis. *International Journal of Obesity*, 25(Suppl 5), S56-S62. DOI: 10.1038/sj.ijo.0801915.
- Münzberg, H. y Morrison, C. D. (2015). Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism*, 64(1), 13-23. DOI: 10.1016/j.metabol.2014.09.010.
- Nieva-Vázquez, A., Pérez-Fuentes, R., Torres-Rasgado, E., López-López, J. G. y Romero, J. R. (2014). Serum Resistin Levels Are Associated with Adiposity and Insulin Sensitivity in Obese Hispanic Subjects. *Metabolic Syndrome and related disorders*, 12(2), 143-148. DOI: 10.1089/met.2013.0118.
- Obradovic, M. et al. (2021). Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 18:12, 585887. DOI: 10.3389/fendo.2021.585887.
- Tzanavari, T., Giannogonas, P. y Karalis, K. P. (2010). TNF-alpha and obesity. *Curr Dir Autoimmun*, 11, 145-156. DOI: 10.1159/000289203.
- Wang, D., Wai Kan, A. Atanasov, A. G. (2022). A Review: Molecular Mechanism of Regulation of ABCA1 Expression. *Curr Protein Pept Sci*, 23(3), 170-191. DOI: 10.2174/1389203723666220429083753.

La medicina genómica de la diabetes mellitus

Carmen Magdalena Gurrola Díaz
Belinda Vargas Guerrero

Paloma Lucía Guerra Ávila
Griselda Hernández Tapia

Introducción

La diabetes es una enfermedad no transmisible caracterizada por presentar hiperglucemia crónica. Dependiendo de los factores que la causen, se clasifica de la siguiente manera:

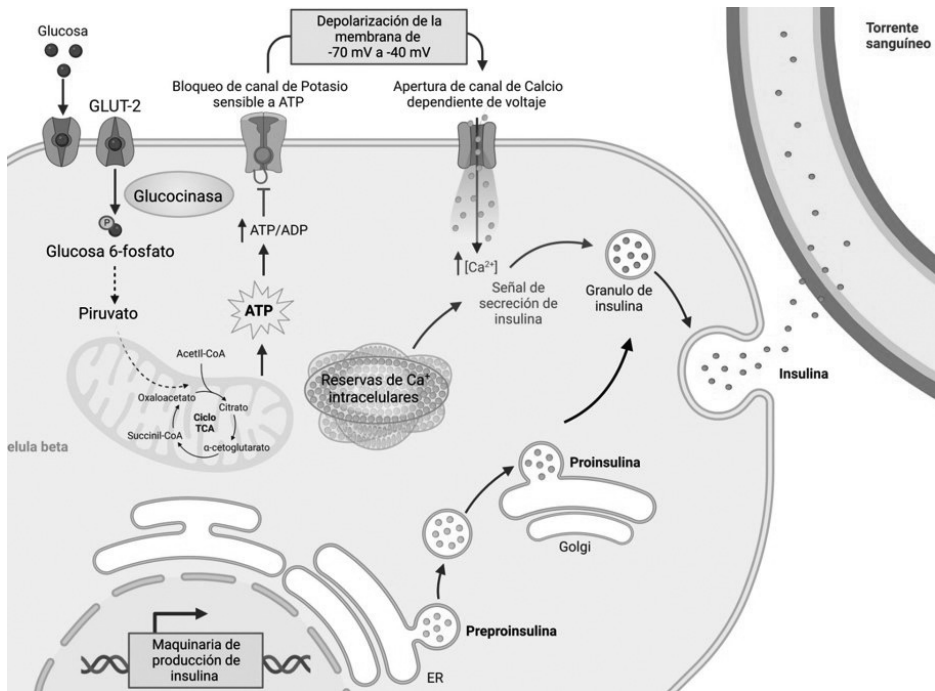
- ♦ Diabetes tipo 1: se produce por la destrucción autoinmune de las células β - pancreáticas.
- ♦ Diabetes tipo 2: se genera por la pérdida progresiva de la secreción y/o acción de la insulina.
- ♦ Diabetes gestacional: se diagnostica durante el embarazo en el segundo o tercer trimestre.
- ♦ Diabetes tipo *mody* (del inglés *maturity onset diabetes of the young*): se presenta en la juventud, asociada a la mutación de un gen y está relacionada con historia familiar.
- ♦ Diabetes generada debida a otras causas: la diabetes es generada por el tratamiento prolongado con glucocorticoides, presencia de pancreatitis o fibrosis quística, etcétera.

De los tipos mencionados, la diabetes mellitus tipo 2 es la más común, representando más del 80% del total de los casos, mientras que el resto se generan por la diabetes tipo 1 y el resto de los tipos de diabetes (5-10%). Por lo anterior, es fundamental diagnosticar el tipo de diabetes de un paciente debido a que si bien, en todos los casos se presenta hiperglucemia, su evolución y tratamiento son diferentes.

Vía de señalización de insulina

Como se mencionó anteriormente la diabetes tipo 2 (DT2) es la más predominante y puede presentar diversas complicaciones como hipertensión arterial, neuropatía diabética, dislipidemia, nefropatía, entre otras. Una molécula clave en el desarrollo de la DT2 es la insulina, una proteína de 51 aminoácidos con función hormonal secretada por las células β de los islotes de Langerhans en el páncreas, la cual es clave en la regulación del metabolismo de glucosa. Esta representa el estímulo principal para la secreción de la insulina, por lo cual, de manera fisiológica al incrementarse la glucemia tras la ingestión de alimentos, se internaliza la glucosa en las células pancreáticas por medio del glucotransportador 2 (GLUT 2). Una vez dentro, la glucosa es fosforilada por medio de la glucoquinasa para formar glucosa-6-fosfato (G-6- P), la cual entra a glucólisis. Posteriormente, se produce un cambio en la relación ATP/ADP, lo que ocasiona una despolarización de la membrana debido al cierre de los canales de KATP y la apertura de los canales de Ca^{++} . El incremento de la concentración de Ca^{++} intracelular conduce a la secreción de la insulina almacenada en las células β pancreáticas, la cual es transportada por el torrente sanguíneo para unirse a su receptor localizado en la membrana de las células blanco (véase figura 1).

FIGURA 1. SECRECIÓN DE LA INSULINA



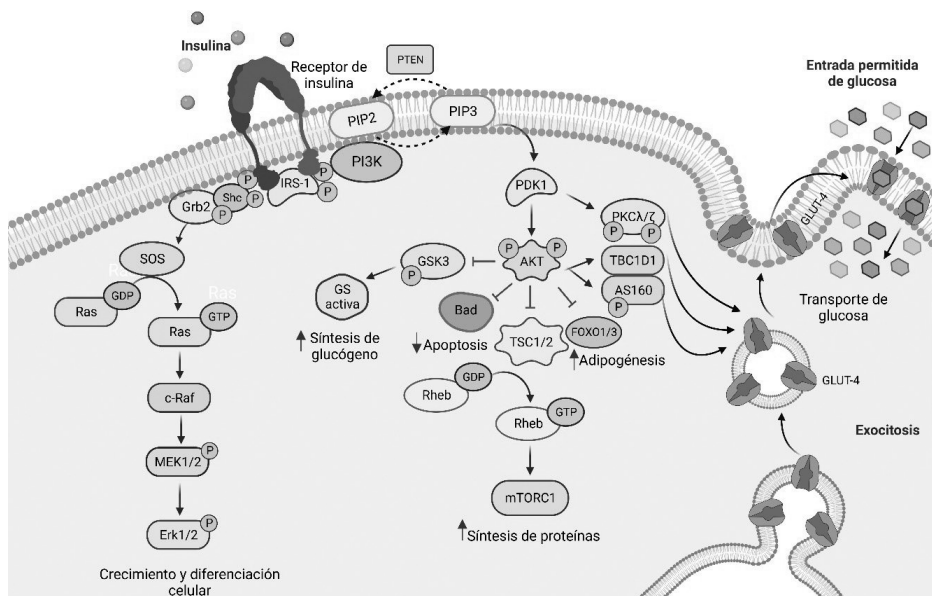
El incremento en la concentración de glucosa tras el consumo de alimentos produce la secreción de insulina en las células β -pancreáticas de los islotes de Langerhans.

En los órganos diana, las dos vías principales de señalización que activa la insulina es la de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)/proteína cinasa B (AKT) y la vía de Raf/Ras/Mek/MAPK. La vía de PI3K es la responsable de la mayoría de los efectos metabólicos de la insulina. Al unirse la insulina a su receptor, este se fosforila en el residuo de tirosina quinasa de la subunidad β transmembranal reclutando al sustrato del receptor de insulina (IRS). En el músculo y tejido adiposo se encuentra el IRS1 y en el hígado, células beta pancreáticas y neuronas el IRS2. Posteriormente, se activa la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) para la formación de fosfatidilinositol-3,4,5-fosfato (PIP3). Posteriormente, PDK activa a las tres isoformas de AKT generando las siguientes respuestas fisiológicas: a) en el hígado y músculo, síntesis de glucógeno a través de la activación de GSK3 (glucógeno sintasa cinasa 3), b) en el hígado, inhibición de la gluconeogénesis por medio de la fosforilación de FOXO, c) en músculo y tejido adiposo incremento del transporte de glucosa a través de la activación

del sustrato de AKT de 160kDa (AS160) y participación en la regulación de la síntesis de proteínas a través de mTOR.

Por otro lado, la activación de la vía de MAPK está involucrada en la regulación de la expresión génica y en el control de la mitosis y diferenciación celular. Respecto al músculo, la insulina a través de la señalización de PI3K estimula la translocación de las vesículas de almacenamiento (GSV) del GLUT₄ a la membrana plasmática, para que se internalice glucosa para su oxidación.

FIGURA 2. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA



La unión de la insulina a su receptor produce la activación de diversas moléculas conduciendo a diferentes respuestas fisiológicas.

En la DT2 existen diversos factores que contribuyen a generar resistencia a la insulina, como lo es la acumulación de lípidos en hígado y músculo, el incremento de ácidos grasos circulantes, la disfunción mitocondrial, aumento del estrés del retículo endoplasmático e hiperglucemia. Lo anterior disminuye la fosforilación de los residuos de tirosina e incrementa la fosforilación de los residuos de serina y treonina, provocando resistencia a la insulina. Asimismo, se ha descrito que los ácidos grasos participan en la resistencia de insulina

incrementando la fosforilación de los residuos de serina/treonina a través del receptor TLR4, el cual activa vías de señalización, como la del inhibidor de $\kappa\beta$ cinasa (IKK) y de la c-Jun amino terminal cinasas (JNK). La activación de la vía de JNK produce, además de resistencia a la insulina, diferentes efectos en los tejidos. En el hígado produce esteatosis, en tejido adiposo incrementa la expresión de citocinas proinflamatorias, como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , y en páncreas produce la muerte de las células β y, por ende, disminución de la secreción de insulina. Además, la vía de señalización de la insulina se ve afectada y se reduce la captación de glucosa en músculo y la activación de la gluconeogénesis en hígado. Por su parte, en tejido adiposo incrementa la lipólisis y produce disfunción de los vasos sanguíneos.

Genética de la diabetes tipo 2

La diabetes tipo 2 es una enfermedad heterogénea y multifactorial, con manifestaciones fenotípicas que varían entre los individuos afectados. El desarrollo de esta enfermedad está directamente asociado a factores ambientales y genéticos. La prevalencia de esta enfermedad depende de la etnia de los individuos, de tal manera que las poblaciones negras e hispanas tienen una mayor prevalencia comparadas con las poblaciones asiáticas y blancas. La heredabilidad también está asociada a la etnia. En familias escandinavas, por ejemplo, la heredabilidad va del 25%-69%. Si se considera todo el continente europeo, el porcentaje aumenta al 72%, y si se analiza el continente norteamericano, el porcentaje disminuye al 52%.

La diabetes tipo 2 es una enfermedad compleja. Los estudios epidemiológicos demuestran que su desarrollo está directamente relacionado con los factores ambientales a los que el individuo está expuesto. Sin embargo, la predisposición correlaciona con la presencia de múltiples variantes genéticas dentro del genoma de cada individuo. Entre los primeros estudios genéticos realizados para la diabetes tipo 2, se encontraron diversos genes con variantes asociadas a la protección o susceptibilidad de desarrollar esta enfermedad, entre los que destacan las variantes de los genes PPARG, KCNJ11 y TCF7L2 (véase tabla 1).

TABLA 1. PRINCIPALES GENES ASOCIADOS CON LA PROTECCIÓN Y SUSCEPTIBILIDAD A DIABETES TIPO 2

GEN	PROTEÍNA	POLIMORFISMO	REGIÓN CROMOSÓMICA	EFEECTO EN DIABETES TIPO 2	POBLACIÓN
<i>PPARG</i>	PPAR γ	rs1801282 Cambio de Pro12Ala	3p25.2	Efecto protector, ya que induce mayor sensibilidad a la insulina	Europa, Asia Oriental/ Sur Oriental
<i>KCNJ11</i>	Kir6.2	rs5219 Cambio de Glu23Lys	11p15.1	Aumenta el riesgo de desarrollar la enfermedad, debido a que disminuye la secreción de insulina	América, Asia Oriental, Europa, Medio Oriente
<i>TCF7L2</i>	TCF7L2	rs7903146 Variante intrónica	10q25.3	Aumenta el riesgo de desarrollar la enfermedad, al impedir la homeostasis de la glucosa y la secreción de la insulina	Brasil este y sur de Asia, población árabe, caucásica, africana

Gen PPARG

El gen PPARG se encuentra en la región 3p25.2 y codifica a varios factores de transcripción llamados receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs, por sus siglas en inglés, *peroxisome proliferator-activated receptors*), que pertenecen a la familia de receptores nucleares. Entre las diversas proteínas que conforman esta familia, PPAR γ se encarga principalmente de iniciar la transcripción de genes asociados a los procesos de adipogénesis y homeostasis de la glucosa. Su sobreexpresión en células de músculo e hígado tiene un impacto importante en la sensibilidad de estos tejidos a la insulina.

En una evaluación de la asociación de la variante rs1801282 (cambio de Pro12Ala) en el exón B, con la susceptibilidad de desarrollar diabetes tipo 2, se encontró que en los individuos pertenecientes a poblaciones de Europa, Asia Oriental y Asia Sur

Oriental, el cambio por alanina presentaba un efecto protector contra el desarrollo de esta enfermedad. En los diversos estudios realizados sobre el efecto biológico de esta sustitución, se determinó que la presencia de la alanina disminuye la afinidad de la proteína PPAR γ por diversos ligandos endógenos (ácidos grasos y ecosanoides), lo que en consecuencia induce una reducción en su actividad protranscripcional, lo que permite que se mantenga la sensibilidad basal de los tejidos a la insulina.

Gen KCNJ11

El gen KCNJ11 se encuentra en la región 11p15.1 y carece de secuencias intrónicas. Pertenecce a la familia de genes de canales de potasio y codifica a la subunidad Kir 6.2. Esta, junto con la subunidad SUR1, componen la estructura del canal de iones de potasio, llamado KATP. Este canal se encuentra principalmente en la membrana plasmática de las células β del páncreas, y modula la producción de insulina y su secreción. KCNJ11 presenta 219 polimorfismos, de los cuales tres (rs5219, rs5215, rs5210) están asociados a la susceptibilidad de desarrollar diabetes tipo 2.

De las tres variantes antes mencionadas, la rs5219 (cambio de la Glu23Lys), es la que presenta una mayor asociación con el desarrollo de la diabetes tipo 2, razón por la que ha sido estudiada en múltiples poblaciones. Se ha reportado que la variante rs5219 está asociada con un aumento en el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2, en individuos pertenecientes a poblaciones de América, Asia Oriental, Europa y Medio Oriente, siendo esta última la de menor riesgo. Por sí misma, la presencia de lisina no tiene un impacto significativo en la actividad y función de la subunidad Kir6.2; sin embargo, al acoplarse con SUR1 para formar el canal KATP, disminuye la sensibilidad de esta proteína por el ATP, lo que produce una disminución en la secreción de insulina.

Gen TCF7L2

El gen TCF7L2 se encuentra en la región 10q25.3. Codifica al factor de transcripción 7 (TCF7L2), el cual pertenece a la familia de factores T celulares. Este fue el primer gen en ser asociado a la susceptibilidad de desarrollar diabetes tipo 2. El

resultado de un metaanálisis de las diversas variantes del gen TCF7L2, demostró que alrededor del 20% de los individuos diagnosticados con diabetes tipo 2 presentan alguna de las variantes de este gen. Las variantes asociadas a esta enfermedad afectan el correcto funcionamiento de las células β pancreáticas, específicamente impiden la homeostasis de la glucosa y la secreción de la insulina.

Múltiples estudios establecen que la variante intrónica rs7903146 es la que presenta una mayor asociación con la diabetes tipo 2. Al respecto, se encontró que esta variante aumenta la susceptibilidad a desarrollar esta enfermedad en los individuos pertenecientes a las poblaciones caucásicas, del este y sur asiáticas, árabes, africanas y brasileñas. Aunado a lo anterior, se ha reportado que ciertas variantes están asociadas a la enfermedad en poblaciones específicas. Un ejemplo de esto es lo reportado para las variantes intrónicas rs114770437, rs7896811, rs11196199 y rs11196203, las cuales están asociadas a la susceptibilidad de desarrollar diabetes tipo 2 en población con ascendencia africana directa. De manera similar, se encontró que la variante rs290487-C está relacionada con el desarrollo de esta enfermedad en la población han en China.

Genes adicionales asociados con el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2

Además de los genes PPARG, KCNJ11 y TCF7L2, gracias a los estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés, *Genome-Wide Association Study*) fue posible identificar nuevas variantes genéticas asociadas al desarrollo de la diabetes tipo 2, que para el año 2022 contabilizaban más de 500 variantes en diferentes poblaciones en el mundo (Kreienkamp *et al.*, 2023). A continuación, se abordarán las mas destacables, las cuales pertenecen a los genes CAPN10, IRS-1, IRS-2, HNF1A y HNF1B (véase tabla 2).

El gen CAPN10 esta localizado en la región 2q37. Expresa a la proteína calpaína 10, la cual pertenece a la familia de proteasas de cisteína. Se ha identificado que la variante intrónica SNP-44 (rs2975760), así como los diversos haplotipos compuestos por las variantes intrónicas SNP43 (rs3792267), SNP19 (rs3842570) y SNP63 (rs5030952), del gen CAPN10, incrementan el riesgo de

desarrollar diabetes tipo 2 en los individuos pertenecientes a las poblaciones mexicana-americana, polaca, japonesa, coreana, tunecina y egipcia. Por otro lado, la reducción en la expresión de calpaína 10 está asociada a una resistencia a la insulina en los diversos tejidos musculares. Lo anterior debido que esta proteína es una de las principales mediadoras de la translocación de GLUT4 a la membrana celular. GLUT4 es una proteína glucotransportadora, capaz de captar e internalizar glucosa a la célula, al recibir la señal por parte de los receptores a insulina.

Los genes IRS-1 (región 2q36.3) e IRS-2 (región 13q34) expresan proteínas pertenecientes a la familia de sustratos del receptor a insulina (IRS, por sus siglas en inglés, *Insulin Receptor Substrates*). Estos receptores se encuentran en el citoplasma celular y son activados como parte de la cascada de señalización iniciada por la unión de la insulina con un receptor extracelular. La proteína IRS-1 es fosforilada para su activación, tras lo cual interacciona y activa otras proteínas intracelulares, entre las que se encuentran los GLUT (principales transportadores de glucosa). El polimorfismo rs1801278 (sustitución de Gly972Arg), del gen IRS-1, está asociado con el desarrollo de diabetes tipo 2 en individuos de las poblaciones mexicanas, caucásicas, asiáticas, sudamericanas y paquistaníes. Lo anterior se debe a que la presencia de arginina en la cadena de aminoácidos disminuye la fosforilación de esta proteína, necesaria para su activación.

IRS-2 tiene la misma actividad biológica que IRS-1, la diferencia radica en que para activarla se requiere que los receptores extracelulares detecten una mayor cantidad de insulina. El polimorfismo rs1805097 (sustitución de Gly1057Asp), en el gen IRS-2, está asociado con el desarrollo de diabetes tipo 2 en individuos de poblaciones del Medio Oriente e India. Lo anterior es consecuencia de la sustitución por ácido aspártico en la cadena de aminoácidos, ya que disminuye IRS-2 su acción como activador de otras proteínas intracelulares.

El gen HNF1A (región 12q24.31) y el gen *HNF1B* (región 17q12) codifican a los factores nucleares 1 alfa de hepatocito (HNF-1 α) y beta de hepatocito (HNF-1 β), respectivamente. Pertenecen a la superfamilia de factores de transcripción, encargados de iniciar la transcripción de múltiples genes relacionados con la homeostasis de la glucosa, liberación de insulina y desarrollo celular. Ambas proteínas son altamente expresadas en células pancreáticas. Las mutaciones más comunes en estos genes están asociadas al desarrollo de la diabetes tipo

MODY (del inglés, *Maturity Onset Diabetes of the Young*); sin embargo, se ha reportado que ciertas variantes están asociadas a un aumento en la susceptibilidad de desarrollar diabetes tipo 2.

Se ha identificado que para el gen HNF1A, las variantes rs137853240 (sustitución de Gly319Ser), rs483353044 (sustitución Glu508Lys) y rs1800574 (sustitución Ala98Val) aumentan el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 en individuos de las poblaciones oji-cree (Canadá), mexicana y caucásica, respectivamente. Lo anterior debido a que las variantes mencionadas, disminuyen la actividad protranscripcional del factor HNF-1 α . En el gen HNF1B, las variantes intrónicas rs7501939 y rs4430796 están asociadas con la susceptibilidad de desarrollar diabetes tipo 2 en individuos de las poblaciones chinas, caucásicas y japonesas. Esto debido a que estas variantes disminuyen la expresión de HNF-1 β , afectando el desarrollo de las células β del páncreas, limitando su actividad. Como consecuencia, se reduce la secreción de insulina.

TABLA 2. GENES ADICIONALES QUE SE HAN ASOCIADO CON EL RIESGO DE DESARROLLAR DIABETES TIPO 2

VARIANTES GÉNICAS REPORTADAS PARA LA POBLACIÓN MEXICANA					
Gen	Proteína	Polimorfismo	Región cromosómica	Efecto en diabetes tipo 2	Población
CAPN10	Calpaína 10	rs3792267 rs3842570 rs5030952 Variantes intrónicas en haplotipo	2q37.3	Disminuye la internacionalización de glucosa en tejido, en respuesta a la insulina	México-americana, polaca, japonesa, coreana, tunecina, egipcia
		rs2975760 Variante intrónica			
IRS-1	IRS1	rs1801278 Cambio de Gly972Arg	2q36.3	Disminuye la fosforilación de esta proteína, en presencia de insulina	Mexicana, caucásica, asiática, sudamericana, paquistaní

VARIANTES GÉNICAS REPORTADAS PARA LA POBLACIÓN MEXICANA					
IRS-2	IRS2	rs1805097 Cambio de Gly1057Asp	13q34	Limita su actividad señalizadora en presencia de insulina	Medio Oriente India
HNF1A	HNF-1 α	rs137853240 Cambio de Gly319Ser	12q24.31	Disminuye su actividad protranscripcional	Comunidad oji- cree de Canadá
		rs483353044 Cambio de Glu508Lys			Mexicana latina
		rs1800574 Cambio de Ala98Val			Caucásica
HNF1B	HNF-1 β	rs7501939 rs4430796 Variantes intrónicas	17q12	Disminuye su expresión, lo cual disminuye la capacidad de las células β pancreáticas de secretar insulina	China, caucásica, japonesa

La población mexicana tiene una gran diversidad genética, con una composición étnica heterogénea que incluye, en su mayoría, ascendencia indígena (56%-69%), europea (26%-41.8%) y africana (1.8%-6%). Debido a esta variabilidad, el estudio de las variantes asociadas a la diabetes tipo 2, en México, es compleja. A pesar de esto, se han logrado identificar múltiples genes asociados a la susceptibilidad de desarrollar esta enfermedad. La primera variante asociada con la diabetes tipo 2, en población mestiza mexicana, fue la rs2975760 perteneciente al gen CAPN10. Asimismo, se estudiaron las variantes del gen TCF7L2 en población mexicana, debido a su asociación con el desarrollo de diabetes tipo 2 en un gran número de poblaciones a nivel mundial. Al respecto, se identificó que la variante rs7903146 está asociada al riesgo de desarrollar esta enfermedad para nuestra población.

Se ha identificado que el haplotipo compuesto por las variantes de ascendencia indígena rs117767867, rs13342692, rs13342232, rs75418188 y rs75493593, del gen SLC16A11, están asociadas con la susceptibilidad de desarrollar diabetes

tipo 2 en población mexicana. Posteriormente, se reportó que, por sí misma, la variante rs75493593 del gen mencionado también puede promover la susceptibilidad de desarrollar esta enfermedad. Aunado a lo anterior, se ha observado que, para población indígena y mestiza mexicana, las variantes rs10811661 del gen CDKN2A/2B y rs74800100 del gen LOC387761, están asociadas al riesgo de desarrollar diabetes tipo 2. Es importante mencionar que esta asociación se debe a que ambas variantes están implicadas en la disminución de la secreción de insulina, en respuesta a la presencia de glucosa.

Se han realizado estudios genéticos en las poblaciones que componen las diversas regiones de México. A partir de estos, se ha identificado que las variantes rs1800629 y rs361525, del gen TNFA, están asociadas con el desarrollo de diabetes tipo 2 en la población del noroeste y centro del país. De igual manera, la variante rs17415296 en la región 3'-UTR del gen LEPR y la variante rs4994 del gen ADBR3, están asociadas con el riesgo de desarrollar esta enfermedad, en individuos del centro de México (Ciudad de México). La asociación mencionada se debe a que estas variantes fomentan la resistencia a la insulina en diversos tejidos.

Existen otras variantes en la población mexicana que han sido asociadas a la susceptibilidad de desarrollar diabetes tipo 2; sin embargo, estas han sido escasamente estudiadas. Se ha reportado una asociación de riesgo para las variantes rs7754840 del gen CDKAL1, rs12779790 del gen CDC123/CAMK1D, rs13266634 del gen SLC30A8, rs7923837 del gen HHEX, rs4402960 del gen IGFBP2 y rs2237897 del gen KCNQ1 en población mestiza mexicana. Aunado a lo anterior, se ha identificado que una variante rara del gen HNF1A (rs483353044), asociada a la susceptibilidad de desarrollar diabetes tipo 2 en población mestiza mexicana y poblaciones latinoamericanas.

Pruebas de laboratorio basadas en el perfil genético

En la actualidad existen pruebas de laboratorio que, por medio de la evaluación del perfil genético, permiten determinar la predisposición genética de una persona a desarrollar DT2. Si bien, la DT2 es una patología multifuncional, el componente genético juega un papel importante en su desarrollo. Por lo cual, la

evaluación del riesgo de la predisposición genética para el desarrollo de DT2 es de gran apoyo para el personal de salud. En conjunto con la evaluación clínica, se puede realizar una estrategia más eficaz tanto en la prevención del desarrollo de esta patología, como en su abordaje terapéutico previniendo el desarrollo de complicaciones relacionadas.

Una de estas pruebas es DIABETESpredictTM desarrollada por el Instituto Broad del MIT, Harvard y el Hospital General de Massachusetts. En la que, en una muestra de mucosa bucal, se analizan 16 genes implicados en el desarrollo de diabetes y se proporciona una puntuación de riesgo del paciente a desarrollar DT2. Además, existen en el mercado otros estudios genéticos para evaluar la predisposición a desarrollar diabetes, como el de VIVOLABS, donde se analizan a través de una muestra de mucosa bucal los genes FABP2, ADIPOQ, PPARG, IRS1 e IL6 (véase tabla 3), los cuales están asociados con DT2. Por otro lado, la prueba de BodyFit analiza a partir de ADN de una muestra de saliva, el riesgo de desarrollar DT2 a partir del análisis de diversos genes, como son FTO, APOA2, ABCA1, ADIPOQ, CAPN10, SLC16A11, entre otros.

TABLA 3. ALGUNOS GENES ANALIZADOS POR PRUEBAS DE RIESGO GENÉTICO A DESARROLLAR DM2

Gen	Localización	Proteína a la que codifica	Función de la proteína	Tejido en el que se expresa	Repositorio virtual
FABP2	4q26	FABP2 proteína de unión a ácidos grasos 2	Captación, metabolismo intracelular y transporte de los ácidos grasos de cadena larga	Intestino delgado	OMIM
ABCA1	9q31.1	Subfamilia de cassettes de unión a ATP Miembro 1	Síntesis de HDL y fosfolípidos de membrana	Adipocitos, vesícula biliar, vejiga	Protein Atlas, Genecards
ADIPOQ	11q23	Adiponectina	Adipocitocina involucrada en el control del metabolismo de grasas y en la sensibilidad a la insulina	Adipocitos	Uniprot

Gen	Localización	Proteína a la que codifica	Función de la proteína	Tejido en el que se expresa	Repositorio virtual
APOA2	1q23.3	Apolipoproteína A-II	Modula la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL)	Hepatocitos	Bvsauld, Genecards, Protein Atlas
CAPN10	2q37.3	Calpaina 10	Participa en la captación de glucosa estimulada por insulina	Ubicua	Genecard, Protein Atlas
FTO	16q12.2	Dioxigenasa dependiente de alfa-cetoglutarato	Actúa como regulador de la adipogénesis y la homeostasis energética	Expresión en múltiples tejidos, especialmente en cerebro, células glandulares y tejido músculo-esquelético	Genecards, Protein Atlas
PPARG	3p25.2	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	Regula la diferenciación del adipocito y la homeostasis de la glucosa	Tejido adiposo, vejiga y colon	NCBI Gene, Protein Atlas
IRS1	2q36.3	Sustrato del receptor de insulina 1	Activación de la vía de señalización de insulina	En varios tejidos, sobreexpresado en músculo, tejido adiposo	NCBI Gene
IL6	7p15.3	Interlucina 6	Amplia variedad de funciones biológicas en inmunidad, regeneración de tejidos y metabolismo	Tejido adiposo, vejiga	Protein Atlas
SLC16A11	17p13.1	Familia de transportadores de solutos 16 miembro 11	Probablemente involucrado en el metabolismo de los lípidos hepáticos	Hígado y riñón	Genecard, Protein Atlas

Finalmente, este tipo de pruebas son recomendadas para personas con sobrepeso u obesidad, con antecedentes de familiares con diabetes, haber presentado diabetes gestacional, etc., con la finalidad de que el paciente pueda tener una atención personalizada, dirigida a un mejor abordaje farmacológico, nutricional y de actividad física, lo que se traducirá en una mejor calidad de vida.

Actualidades sobre los genes de susceptibilidad a la diabetes

En el caso específico de la diabetes tipo 2, se han realizado estudios moleculares para conocer cuáles genes pueden participar en el desarrollo de esta patología. Al respecto, a través de análisis bioinformático, se ha identificado que existen factores transcripcionales que potencialmente modulan la diabetes tipo 2. Entre estos factores transcripcionales se encuentra el factor nuclear 1 alfa de hepatocito (HNF1A, por su abreviatura del inglés *hepatocyte nuclear factor 1-alpha*) que tiene una función primordial dentro del proceso de diferenciación de las células beta pancreáticas. La disfunción más frecuente de las células beta pancreáticas, observada en la diabetes tipo 2, reflejada en una resistencia a la insulina, se puede valorar laboratorialmente, aunado a datos clínicos, con las pruebas de tolerancia oral a la glucosa y el modelo de evaluación de la homeostasis (HOMA, del inglés *homeostasis model assessment*). En un estudio, se evaluó cuál era el impacto del polimorfismo I27L (rs1169288) en el gen del factor nuclear 1 alfa de hepatocito y se relacionó con los índices laboratoriales mencionados para evaluar la función de las células beta pancreáticas. En un estudio posterior, se encontró que este polimorfismo presente en el gen del factor nuclear 1 alfa de hepatocito tiene impacto al disminuir la masa de células beta pancreáticas, provocando un mayor riesgo de diabetes tipo 2. En humanos, un alelo defectuoso para HNF1A causa diabetes del tipo MODY3 (del inglés, *maturity onset diabetes of the young*). Por otro lado, se ha demostrado que la sobreexpresión excesiva de HNF1A puede generar una disminución en la expresión de GLUT2, reducción de la masa de células beta y deterioro de la función de las células beta, generando diabetes en ratones. También se determinó el efecto que presentaba el factor nuclear 1 alfa de hepatocito (factor transcripcional) sobre

la regulación de glucosa y en la expresión génica de la dipeptidil peptidasa 4 (del inglés *dipeptidyl peptidase IV*, DPP4 también conocida como CD26). Se ha reportado que la actividad enzimática de la DPP4 se encuentra alterada en los pacientes con diabetes tipo 2. La DPP4 es una glucoproteína que corta dipéptidos de los extremos N-terminales de ciertos polipéptidos bioactivos, especialmente aquellos que tienen una alanina o prolina en la segunda posición, lo cual modula la actividad biológica de estos péptidos, también conocidos como incretinas. Uno de estos polipéptidos biológicamente activos es el péptido similar a glucagon tipo 1 (del inglés, *glucagon-like peptide*, GLP-1). Este péptido es secretado por el intestino delgado, posterior a la ingesta de alimentos y potencia la secreción de insulina inducida por glucosa y finalmente participa en los mecanismos de saciedad. Sin embargo, en pacientes diabéticos la DPP4 degrada GLP-1 y reduce la secreción temprana postprandial de insulina. Al prevenir la inhibición de GLP-1 se mejora sustancialmente la tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. Por tanto, los inhibidores de DPP4 constituyen un grupo de fármacos hipoglucemiantes que se han utilizado ampliamente para el manejo y la mejora metabólica de los pacientes con diabetes tipo 2.

El receptor a glucocorticoides (GR, del inglés *glucocorticoid receptor*) también denominado NR 3C1 (del inglés, *nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1*) es un receptor que se une al cortisol y otros glucocorticoides. Se encuentra expresado en casi todas las células e interviene en la regulación del metabolismo y sistema inmunológico. Debido a que el gen presenta diferentes isoformas, estas ejercen diferentes funciones, proporcionando la característica de ser pleiotrópico, ya que puede ejercer funciones anti- o proinflamatorias, dependiendo de su localización celular (citoplasma o núcleo) y su unión al ligando. El polimorfismo BclI (rs41423247) que implica una sustitución de C/G de intrón 2 de este gen (646 bases río abajo del exón 2) contribuye a la resistencia a insulina e hiperinsulinemia. Los portadores homocigotos del polimorfismo BclI del gen GR presentan una composición de grasa corporal total significativamente mayor a que en individuos heterocigotos. Lo anterior contribuye a un elevado índice HOMA2-IR (del inglés, *homeostasis model assessment of insulin resistance*). Para explicar el mecanismo de las alteraciones metabólicas y la presencia de este polimorfismo en un intrón, se descartó que tuviera un papel durante el procesamiento del pre-ARNm del receptor a glucocorticoides o en corte y empalme alternativo. Una posibilidad es que el polimorfismo estuviera ligado a variaciones en la región promotora

(aumentando su expresión) o incrementando la estabilidad de la región 3' no traducida (3'-UTR, del inglés *3'untranslated region*). Al respecto, se reportó que individuos homocigotos con la enfermedad de Addison (insuficiencia cortico-suprarrenal crónica) presentaban una alta prevalencia de adiposidad central, baja tolerancia a la glucosa, dislipidemia y diabetes. Además del polimorfismo BclI, se han reportado otros como ER22/23EK (rs6189 y rs6190) que corresponden a dos polimorfismos en los codones 22 y 23 del exón 2. Estos polimorfismos de nucleótido único (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*) confieren una respuesta de resistencia a glucocorticoides. Los sujetos sanos, de edad avanzada, que eran portadores del polimorfismo ER22/23EK presentaron una menor concentración de colesterol total y niveles más bajos de insulina en ayuno. En otro estudio se demostró que el efecto del polimorfismo ER22/23EK dependía del sexo de los participantes. Se reclutaron individuos con tolerancia normal o baja a la glucosa, y se asoció el polimorfismo ER22/23EK con parámetros relacionados a una función reducida de células beta del páncreas, más solo en mujeres y no en hombres. Al respecto, se ha argumentado que los factores hormonales afectan la función de las células beta pancreáticas. Así como también se debe considerar que la concentración de estrógenos se considera factor protector de las células beta. De esta manera, las mujeres premenopáusicas y las mujeres menopáusicas tratadas con reemplazos hormonales presentan una prevalencia menor de diabetes. Finalmente, se confirma la compleja naturaleza multifactorial de la diabetes, y el enorme desafío para encontrar un tratamiento que estabilice la enfermedad o incluso revierta su estado hacia la homeostasis de la glucosa.

Referencias

- American Diabetes Association Professional Practice Committee (2022). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care*, 45(Supplement_1), S17-S38. <https://doi.org/10.2337/dc22-S002>
- Bappy, H. M. J. A., Goswami, A., Huda, N., Hosen, M. I. y Nabi, A. H. M. N. (2020). Gender specific association of missense variant rs1805097 of IRS-2 and noncoding variant rs841853 of GLUT-1 genes with susceptibility to type 2 diabetes in Bangladeshi population. *Gene Reports*, 21, 100866. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100866>

- Bateman, A., Martin, M., Orchard, S., Magrane, M., Ahmad, S., Alpi, E., Bowler-Barnett, E. H., Britto, R., Bye-A-Jee, H., Cukura, A., Denny, P., Dogan, T., Ebenezer, T., Fan, J., Garmiri, P., Da Costa Gonzales, L. J., Hatton-Ellis, E., Hussein, A., Ignatchenko, A. y Zhang, J. (2022). UniProt: The Universal Protein Knowledge-base in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D523-D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
- Batista T. M., Haider N. y Kahn C. R. (2021). Defining the underlying defect in insulin action in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 64(5), 994-1006. <https://doi.org/10.1007/s00125-021-05415-5>
- Del Bosque-Plata, L., Martínez-Martínez, E., Espinoza-Camacho, M. A. y Gragnoli, C. (2021). The Role of TCF7L2 in Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 70(6), 1220-1228. <https://doi.org/10.2337/db20-0573>
- De Meyts, P. (2000). *The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network*. Endotext. MDText.com, Inc. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK378978/>
- El-Far, S. W., Kassem, H. Sh., Embaby, A. M., Saad, A. A., Mowafy, N. y Haroun, M. (2022). Association of CAPN10 haplotype combinations with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome among Egyptians: Pilot study—genotyping of three CAPN10 variants. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 23(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s43042-022-00212-0>
- Goncalves, M. D. y Farooki, A. (2022). Management of Phosphatidylinositol-3-Kinase Inhibitor-Associated Hyperglycemia. *Integrative Cancer Therapies*, 21, 153473542110731. <https://doi.org/10.1177/15347354211073163>
- Huang, T., Wang, L., Bai, M., Zheng, J., Yuan, D., He, Y., Wang, Y., Jin, T. y Cui, W. (2020). Influence of IGF2BP2, HMG20A, and HNF1B genetic polymorphisms on the susceptibility to Type 2 diabetes mellitus in Chinese Han population. *Bioscience Reports*, 40(5), BSR20193955. <https://doi.org/10.1042/BSR20193955>
- Ijaz, A., Babar, S., Sarwar, S., Shahid, S. U. y Shabana. (2019). The combined role of allelic variants of IRS-1 and IRS-2 genes in susceptibility to type2 diabetes in the Punjabi Pakistani subjects. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 11(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13098-019-0459-1>
- Julve, J., Muñoz-García, C., Santos, D., Blanco-Vaca, F. y Escolà-Gil, J. C. (2010). La apolipoproteína A-II altera la composición apolipoproteica de HDL y su capacidad para activar la lipoproteína lipasa. *Clin. Investig. Arterioscler. (Ed. Impr.)*, 22(5), 192-197. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ibc-95228>

- Kreienkamp, R. J., Voight, B. F., Gloyn, A. L. y Udler, M. S. (2023). *Genetics of Type 2 diabetes*. Diabetes in America. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK597726/>
- Li, L. M., Jiang, B. G. y Sun, L. L. (2022). HNF1A: From Monogenic Diabetes to Type 2 Diabetes and Gestational Diabetes Mellitus. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 829565. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.829565>
- Moazzam-Jazi, M., Najd-Hassan-Bonab, L., Masjoudi, S., Tohidi, M., Hedayati, M., Azizi, F. y Daneshpour, M. S. (2022). Risk of type 2 diabetes and KCNJ11 gene polymorphisms: A nested case-control study and meta-analysis. *Scientific Reports*, 12(1), 20709. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24931-x>
- Online Mendelian Inheritance in Man (2024). McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD). <https://omim.org/>
- Sánchez-Pozos, K. y Menjívar, M. (2016). Genetic Component of Type 2 Diabetes in a Mexican Population. *Archives of Medical Research*, 47(7), 496-505. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2016.12.007>
- Sarhangi, N., Sharifi, F., Hashemian, L., Hassani Doabsari, M., Heshmatzad, K., Rahbaran, M., Jamaldini, S. H., Aghaei Meybodi, H. R. y Hasanzad, M. (2020). PPARG (Pro12Ala) genetic variant and risk of T2DM: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 10(1), 12764. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69363-7>
- Sayers, E. W., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D. C., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., Skripchenko, Y. y Sherry, S. T. (2021). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D20-D26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>
- Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., Stein, T. I., Nudel, R., Lieder, I., Mazor, Y., Kaplan, S., Dahary, D., Warshawsky, D., Guan-Golan, Y., Kohn, A., Rappaport, N., Safran, M. y Lancet, D. (2016). The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses. *Current Protocols in Bioinformatics*, 54(1). <https://doi.org/10.1002/cpbi.5>
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C. A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S. y Pontén, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347(6220). <https://doi.org/10.1126/science.1260419>

Medicina genómica aplicada a la nutrición

Erika Martínez López

Wendy Yareni Campos Pérez

Mariana Saraí Pérez Robles

La genómica en la nutrición y su impacto en la salud

El término de salud es definido como un estado de completo bienestar físico, mental y social, y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades. Hace 2400 años, el filósofo Hipócrates relacionó el concepto de “salud” con el de “dieta”, él definió “dieta” como un “régimen general de vida” y sugirió que la salud es resultado de la interacción de la dieta, actividad física, higiene y otros aspectos del estilo de vida, por lo que desde ese tiempo ya se consideraba que los factores ambientales son determinantes en el desarrollo de enfermedades. En la actualidad, numerosos estudios epidemiológicos corroboran la relación que existe entre la calidad de la dieta y el proceso salud-enfermedad.

Sin embargo, además de los factores ambientales, los factores genéticos también influyen significativamente en la predisposición de desarrollar enfermedades no solo monogénicas, sino también multifactoriales. En este sentido, se propuso el término “exposoma”, para referirse a la totalidad de exposiciones ambientales, desde la concepción en adelante, que afectan la salud de las personas, donde además se incluye a los factores genéticos de riesgo y la interacción gen-ambiente.

Lo anterior llevó al surgimiento de la genómica nutricional, también conocida como “nutrición molecular”, la cual estudia la relación entre el genoma humano y la dieta apoyándose de la bioinformática y de las nuevas tecnologías “ómicas” como lo son la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica.

Tomando en cuenta lo anterior, la genómica nutricional se ha sustentado en los siguientes principios:

1. En ciertas situaciones y en algunos individuos, la calidad de la dieta puede representar un factor de riesgo relevante para diversas condiciones patológicas multifactoriales.
2. Los nutrimentos y otros compuestos bioactivos contenidos en los alimentos alteran directa o indirectamente la expresión génica.
3. El efecto de la dieta en el organismo depende en gran parte de la constitución genética del individuo.
4. Ciertos genes y sus variantes interaccionan con la dieta, lo cual puede jugar un papel determinante en la aparición de enfermedades multifactoriales.
5. Las consultas de nutrición que incluyan una evaluación completa del estado nutricional y la caracterización del genotipo pueden utilizarse para desarrollar planes de alimentación personalizados que mejoren la salud de los pacientes y prevengan la aparición de comorbilidades metabólicas.

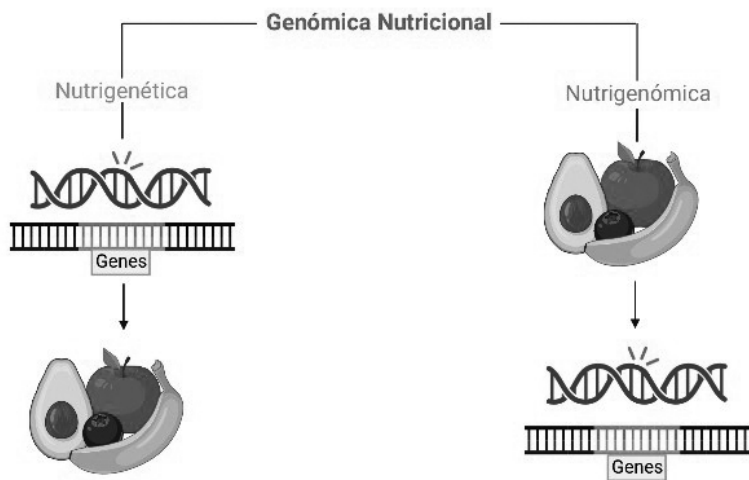
Para su estudio, la genómica nutricional se divide en dos grandes ramas, la nutrigenética y la nutrigenómica, las cuales tienen objetivos diferentes, sin embargo, su finalidad es preservar la salud de las personas a través de la alimentación contemplando su constitución genética.

La nutrigenética estudia las distintas variantes de un solo nucleótido (SNVs) presentes en el genoma y cómo estas influyen en la respuesta del organismo a los distintos macro- y micronutrientes de la dieta. Asimismo, evalúa el riesgo que otorgan las SNV para el desarrollo de enfermedades relacionadas a la nutrición, como obesidad, enfermedades cardiovasculares (ECV), dislipidemias, hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), entre otras. No obstante, también analiza si el efecto de las variantes genéticas puede ser modulado por otras variables, como la dieta, la actividad física, la composición corporal, entre otras.

Por otra parte, la nutrigenómica evalúa el efecto que tienen los nutrientes a nivel molecular, celular y sistémico (véase figura 1), así como los mecanismos moleculares mediante los cuales los nutrientes y componentes bioactivos de la dieta regulan la expresión de genes específicos mediante los siguientes mecanismos:

1. Se unen directamente a factores de transcripción, activando o inhibiéndolos, modificando la transcripción de uno o varios genes.
2. Se unen a receptores nucleares, lo cual permite que migren al núcleo y se unan a la región promotora de un gen, actuando como factores de transcripción.
3. Se unen a receptores de superficie celular, modifican cascadas de señalización y promueven o inhiben de manera indirecta la transcripción de algún gen.

FIGURA 1. GENÓMICA NUTRICIONAL



La nutrigenética estudia las distintas variantes presentes en el genoma y cómo influyen en la respuesta de un individuo a los nutrientes y tipo de alimentación, evaluando el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas no transmisibles. Por otra parte, la nutrigenómica evalúa el efecto que tienen estos nutrientes a nivel genético, molecular, celular y sistémico. Fuente: imagen creada en BioRender.com

Por otro lado, se debe tener en cuenta que existen cambios epigenéticos, derivados de la interacción del individuo con el medio ambiente, incluida su alimentación, que promueven cambios en la expresión de los genes que, aunado a los factores anteriormente mencionados, predisponen al desarrollo de enfermedades.

Debido a lo anteriormente descrito, se propone que, en un futuro próximo, la consulta nutricional siga las pautas de la nutrigenética y nutrigenómica, logrando así la “nutrición de precisión” donde se proporcione a los pacientes “dietas inteligentes” que cumplan con las características anteriormente mencionadas. Es decir, que se tome muestra sanguínea para la extracción de DNA y su posterior determinación de variantes genéticas de interés. Enseguida, acorde a los resultados obtenidos, proporcionar un plan de alimentación con la distribución de nutrientes adecuada según el genotipo de los sujetos. Además, esta dieta inteligente debe incluir alimentos ricos en componentes bioactivos (previamente estudiados por la nutrigenómica) en las cantidades adecuadas, para preservar la salud del paciente y/o que pueda obtener beneficios, según la patología que presente.

Variantes genéticas asociadas a patologías relacionadas con la nutrición

Obesidad

La obesidad es definida como una acumulación anormal o excesiva de grasa corporal que es perjudicial para la salud y afecta a gran parte de la población en el mundo. Diversos factores contribuyen a su desarrollo, entre ellos, el desequilibrio energético entre las calorías consumidas y gastadas y la inactividad física.

A pesar de que los factores de riesgo ambientales son en gran parte modificables, los factores genéticos también contribuyen significativamente al desarrollo de obesidad. En este sentido, existen SNV asociadas a excesiva adiposidad, mayor ganancia de peso corporal, alteraciones en la sensación de hambre-saciedad y variantes que predisponen a preferencias por alimentos hipercalóricos, con alto contenido de azúcar, grasas saturadas y sodio.

El consorcio de Investigación Genética de Rasgos Antropométricos (GIANT) identificó 97 locus asociados con el índice de masa corporal (IMC). Las SNV en el gen asociado a la masa grasa y la obesidad (FTO) son las que más evidencia tienen respecto a la predisposición genética de obesidad, incluso desde la infancia. Este

gen se expresa en diversos tejidos, principalmente en el tejido adiposo y el hipotálamo, además, actúa como regulador de la adipogénesis, la homeostasis energética, el metabolismo de la glucosa y el metabolismo lipídico mediante la regulación en la actividad de diversos genes, es por ello su implicación en la obesidad.

Otro gen diana para el estudio de la obesidad es el que codifica para el receptor de melanocortina 4 (MC4R), este participa en la regulación del apetito y la homeostasis energética. Los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han identificado diversas variantes en el gen que se han asociado con incremento del IMC, así como un mayor consumo de alimentos y kilocalorías totales.

No obstante, se debe considerar que ciertos patrones de alimentación y estilo de vida interactúan con diversas variantes genéticas asociadas a obesidad, por lo que, a pesar de tener la predisposición genética de riesgo, el efecto de la variante puede ser modulado por un adecuado estilo de vida.

Enfermedades cardiovasculares

La obesidad representa un factor de riesgo importante para el desarrollo de diversas enfermedades cardiovasculares (ECV), entre ellas la cardiopatía isquémica, la cual está asociada con un mayor riesgo de mortalidad. Además de la obesidad, existen otros factores de riesgo modificables asociados a la incidencia de ECV, como la ingestión de una dieta aterogénica, la inactividad física, el alcoholismo y el tabaquismo.

No obstante, está establecido que las SNV en genes que codifican para enzimas y/o proteínas con funciones específicas en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas plasmáticas son de suma relevancia, ya que confieren fenotipos lipídicos de riesgo o protectores que se ven reflejados en la incidencia de ECV.

La lipoproteína lipasa (LPL) es una enzima que participa en el metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas con funciones relevantes, ya que su actividad determina parcialmente las concentraciones circulantes de triglicéridos (TG) y de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (c-HDL).

Se han identificado cientos de variantes en el gen que codifica a la LPL. Estudios transversales han reportado que las personas que portan el alelo menor de la variante rs13702 tienen una actividad de la enzima LPL elevada, además se ha asociado con concentraciones más bajas de TG y mayores de c-HDL.

Otro de los genes que mayormente se han asociado con los valores de lípidos séricos y riesgo cardiovascular, es el que codifica para la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP). La variante rs708272 G>A es de las más estudiadas debido a su fuerte efecto sobre las concentraciones de c-HDL.

Se ha evaluado esta variante en población mexicana donde se reporta que los portadores el genotipo GA/AA que además consumían $\geq 5\%$ de las kcal totales de sacarosa mostraron concentraciones más elevadas de colesterol total (CT) en comparación con los que tenían el genotipo GG. Además, también se observaron concentraciones más elevadas de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (c-LDL).

Variantes genéticas relacionadas a preferencias alimentarias

Las preferencias alimentarias están determinadas por numerosos factores, como la disponibilidad de alimentos, aspectos culturales, religiosos, sociales y económicos. Además, los factores genéticos también participan en las preferencias por los sabores dulce, salado, amargo y ácido. Esto contribuye a explicar la relación entre la dieta y el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT).

Por ejemplo, el gen *CD36* codifica la proteína que participa en el reconocimiento de grasas en los alimentos y su absorción en el intestino. La variante rs1761667 en este gen se asocia a una alteración en la percepción de los ácidos grasos y con un incremento significativo en su consumo. Por ello, se ha asociado con mayor riesgo de desarrollar ECV.

Otra variante relacionada con el consumo de grasas es la variante Taq1A del gen que codifica para el receptor de dopamina (*DRD2*) donde los portadores del alelo A reportan una mayor ingestión de grasa total, grasa saturada y colesterol, consecuentemente también una mayor predisposición de desarrollar ECV.

Otro componente de la dieta que se ha asociado con riesgo de desarrollar obesidad y DM2 son los hidratos de carbonos simples añadidos a los alimentos. En este sentido, la variante Ile191Val del gen que codifica el receptor gustativo tipo 1, miembro 2 (*TAS1R2*), se ha asociado con un mayor consumo de este tipo

de hidratos de carbono simples; asimismo, la variante Thr110Ile del gen que codifica para el transportador de glucosa (*SLC2a2*) se ha relacionado con una mayor ingestión.

Dietas basadas en nutrición de precisión en la prevención y tratamiento de patologías relacionadas con la nutrición

Las dietas personalizadas basadas en el genoma para optimizar el éxito de una intervención dietética y disminuir el riesgo de ECNT sigue siendo uno de los desafíos más discutidos en la comunidad científica, donde el análisis heterogéneo de la dieta a través del consumo de macro- y micronutrientes, tipo de alimentos y patrones dietéticos agrega complejidad al estudio de las interacciones entre los genes, la dieta y la implementación de dietas basadas en la nutrición de precisión.

Las ECV, por su parte, representan un alto gasto en tratamientos médicos y una considerable disminución de la calidad de vida del paciente. Respecto a los factores más importantes relacionados con la prevención de las ECV, se encuentra una alimentación saludable, sin embargo, existen controversias en la literatura respecto a su definición y caracterización, misma que ha ido cambiando a lo largo del tiempo. Inicialmente, las recomendaciones de la AHA (por sus siglas en inglés, American Heart Association) se enfocaron en la disminución de las grasas dietéticas totales; después, en 1961 recomendaron específicamente reducir la ingestión de grasas saturadas y colesterol, así como aumentar la ingestión de grasas poliinsaturadas, donde además mencionaron la importancia de que las personas con predisposición genética a dislipidemias se apegaran especialmente a las recomendaciones.

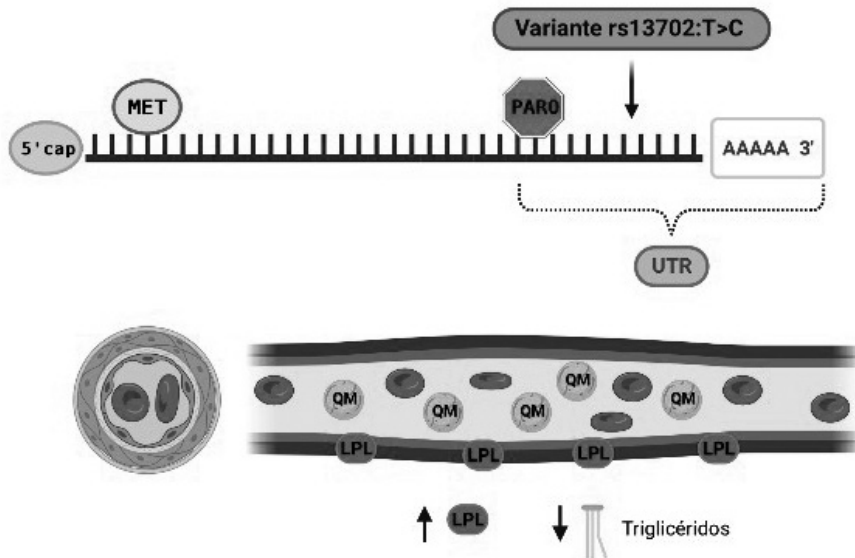
Posteriormente, a finales de la década de 1990, se hizo énfasis en la necesidad de basar las recomendaciones nutricionales en evidencia científica de primer nivel para la prevención de ECV, teniendo en cuenta que cada paciente tiene un genoma particular, así como una exposición diferente a factores ambientales. De esta manera, las recomendaciones nutricionales personalizadas basadas en el genoma se han propuesto como una alternativa importante en la prevención y tratamiento de las ECNT.

Sin embargo, a pesar de las expectativas de las dietas basadas en el genoma, aún nos encontramos en una etapa de transición que necesita consolidarse, siendo la principal limitante la falta de replicación de los estudios existentes entre diferentes poblaciones de estudio.

Entre lo más importante a considerar para realizar dietas basadas en variantes genéticas es una evidencia previa obtenida en estudios de laboratorio y estudios de bioinformática sobre la funcionalidad y efecto de las variantes genéticas, además que la variante genética sea frecuente en la población con un preferente efecto alélico aditivo; también, que la variante tenga asociación con uno o varios fenotipos intermedios considerados de riesgo para el desarrollo de ECV. Asimismo, que la variante presente interacciones gen-dieta, considerando los fenotipos intermedios de riesgo para ECV, y que se haya reportado en otras poblaciones. Además, la variante debe tener evidencia experimental mediante una intervención dietética que muestre interacciones gen-dieta a nivel longitudinal; también, que se asocie con la incidencia de ECV y con la dieta, similar a la descrita para los fenotipos intermedios de la ECV en un ensayo de intervención dietética controlado y aleatorizado.

Conforme a lo anteriormente descrito, todas estas condiciones las cumple la variante rs13702 T > C en *LPL* y su interacción con la dieta en la determinación sérica de los triglicéridos en ayunas (como fenotipo intermedio de ECV) y en la incidencia de infartos (como fenotipo final de ECV). Esta variante está ubicada en la región 3' no traducible (3'UTR, por sus siglas en inglés, *untranslated region*) del gen *LPL* (véase figura 2) en un sitio de unión del microRNA-410, donde el alelo C se asocia con triglicéridos más bajos reportado en un metaanálisis con 27 756 sujetos, misma asociación que se reporta que es modulada por la ingestión de grasas. El alelo C interrumpe un sitio de un elemento de reconocimiento de microRNA, lo que resulta en una ganancia de función.

FIGURA 2. EFECTO DE LA VARIANTE RS13702:T > C EN LPL



Esta variante se ubica en la región 3'UTR del RNA mensajero que codifica a la LPL. Esta variante se encuentra en un sitio de unión de microRNA-410, donde el alelo C se asocia con un menor reconocimiento y con una mayor traducción de la proteína, de manera que se relaciona con una menor concentración de triglicéridos en sangre y una mayor concentración de LPL. Fuente: imagen creada en BioRender.com

El estudio Predimed (prevención con dieta mediterránea) fue un ensayo clínico controlado, aleatorizado, multicéntrico, donde se analizaron los datos de 4131 sujetos con un seguimiento a tres años que cumplieran con uno o dos de estos criterios: DM 2 o ≥ 3 factores de riesgo para ECV (HTA, dislipidemia, IMC ≥ 25 kg/m², ser fumador y/o con historia familiar prematura de ECV). Los participantes fueron asignados aleatoriamente a estas intervenciones: una MedDiet (dos grupos, uno suplementado con aceite de oliva extra virgen y otro con nueces 30 g/d) y un grupo control (dieta baja en grasas). Los participantes asignados a ambos grupos de MedDiet recibieron entrenamiento intensivo para seguir la dieta y se les entregaron raciones de aceite de oliva extra virgen o nueces mixtas, mientras que los asignados a la dieta control recibieron instrucciones para reducir la ingestión de todo tipo de grasas.

Se observó una interacción significativa gen-dieta al inicio del estudio entre la variante rs13702 T>C con la ingestión total de grasas insaturadas, de manera que una mayor ingestión de grasas insaturadas aumentó el efecto decreciente del alelo C sobre los triglicéridos en ayunas. Esta interacción fue similar a la interacción gen-dieta con ácidos grasos poliinsaturados, descrita previamente en el metaanálisis donde se demostró una interacción significativa entre la variante rs13702 y los ácidos grasos poliinsaturados de la dieta con respecto a las concentraciones de triglicéridos con una asociación inversa. Además, cuando se probó el efecto de la intervención Predimed de tres años con dieta mediterránea (alta en ácidos grasos insaturados), se observó una disminución de los triglicéridos en los portadores del alelo C; sin embargo, esta disminución no se detectó en el grupo con dieta control.

Además, la variante se asoció con una menor incidencia de accidente cerebrovascular en el grupo de intervención MedDiet. A su vez, mencionan que cuando se excluyó a los participantes que tomaban fibratos hubo un mayor nivel de significancia estadística para estas interacciones gen-dieta.

Con estos resultados es posible observar cómo a pesar de que un individuo puede ser portador de la variante genética beneficiosa, sus efectos genéticos favorables pueden ser anulados al recibir una intervención dietética (en este caso la dieta control en lugar de la dieta mediterránea) que no es apropiado para su genotipo.

Por otra parte, se ha analizado si las asociaciones entre las variantes genéticas rs17782313 T>C en *MC4R* y rs9939609 C>A en *FTO* con el peso corporal están moduladas por la dieta y la actividad física. En ambas variantes, el alelo menor se asoció con un mayor IMC, sin embargo, se encontró que el IMC en individuos con una alta adherencia a la dieta mediterránea redujeron su IMC de manera significativa en comparación con los individuos que presentaron una adherencia baja a la dieta, a pesar de considerarse como individuos con un alto riesgo genético con 4 o 3 alelos de riesgo considerando los SNVs rs17782313 T>C de *MC4R* y rs9939609 C>A de *FTO*.

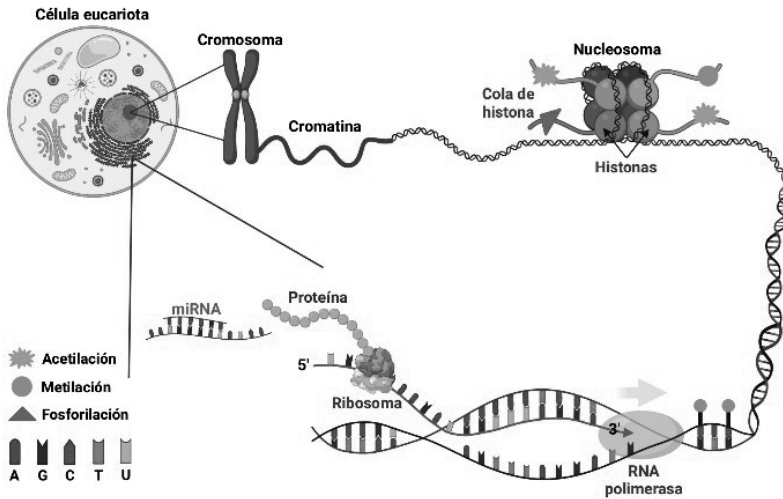
Impacto de la dieta materna sobre el epigenoma

Como parte del estudio de las ciencias ómicas relacionadas con la respuesta del individuo al medio ambiente, se encuentra la epigenética que fue definida por Conrad Waddington (1905-1975) como la capacidad del ambiente que rodea a

un individuo para moldear su fenotipo. De esta forma, infirió la importancia que tiene la interacción de los genes con el ambiente, donde a partir de un único genoma se desarrollan las distintas funciones y tipos celulares, especialmente mediante estímulos específicos en un determinado tiempo y lugar.

La estructura del DNA, que en las células eucariotas se ubica asociado a histonas formando los nucleosomas en el núcleo, puede ser modificada epigenéticamente exponiendo en diferente magnitud al DNA a las moléculas responsables de la transcripción, lo que contribuye a la regulación de la expresión genética a corto, mediano y largo plazo. Estos mecanismos incluyen la metilación del DNA (en regiones 5'-CpG-3'), acetilación y/o modificaciones postraduccionales de histonas, diferencias en la cromatina dependientes de ATP y los microRNAs que, como se mencionó anteriormente, pueden afectar la expresión de los genes (véase figura 3).

FIGURA 3. MECANISMOS EPIGENÉTICOS

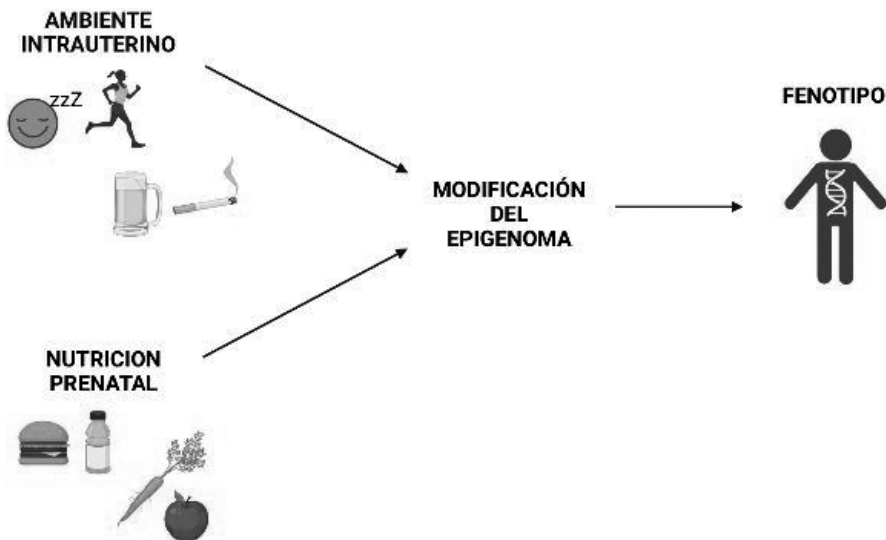


Los mecanismos epigenéticos incluyen la metilación del DNA generalmente en regiones 5'-CpG-3', acetilación, metilación y/o modificaciones postraduccionales de histonas, modificación de la cromatina y los microRNAs. Estos mecanismos determinan el epigenoma y regulan la expresión génica a corto, mediano y largo plazo. Fuente: imagen creada en BioRender.com

La fase del desarrollo que se ubica desde la preconcepción hasta la infancia temprana es uno de los periodos más sensibles respecto a la generación de modificaciones epigenéticas, lo que da lugar a diferentes patrones de expresión génica con efectos a largo plazo.

Debido a que la nutrición forma parte de uno de los factores ambientales más importantes en la interacción de los genes con el ambiente, se ha considerado a la nutrición tanto antes como después del nacimiento, un periodo de gran influencia en el desarrollo fetal e infantil; esto debido a que el feto posee una gran plasticidad y capacidad para reaccionar y responder al estilo de vida y al ambiente materno, siendo la nutrición, sobre todo en esta etapa, un factor con gran capacidad de inducir una metilación permanente en ciertas regiones del DNA. Los nutrientes que componen la dieta como los micronutrientes, las proteínas, grasas e hidratos de carbono, así como la calidad de esta, tienen la capacidad de alterar la manera en la que funcionan y se expresan los genes en el útero y durante los periodos iniciales de la vida a través de la modulación de mecanismos epigenéticos, mismos que pueden ser controlados por el metabolismo de folatos que afectan los procesos de metilación del DNA.

FIGURA 4. FACTORES QUE MODIFICAN EL EPIGENOMA DURANTE EL DESARROLLO FETAL



Existen factores que modifican el epigenoma durante el desarrollo fetal, uno de ellos es el ambiente intrauterino que incluye la calidad del sueño, actividad física, emociones, consumo de alcohol o tabaco, entre otros. Otro factor importante es la nutrición prenatal donde las características de la dieta tienen la capacidad de promover cambios en el epigenoma, que perduran incluso hasta la edad adulta. Fuente: imagen creada en BioRender.com

El riesgo de enfermedad en la edad adulta y su relación con el ambiente intrauterino fue analizado por primera vez por David Barker en la década de 1980, evidenciando una mayor mortalidad por ECV en individuos que al nacer tuvieron bajo peso, datos que después fueron confirmados por otros estudios donde además encontraron una asociación entre el bajo peso al nacimiento con un mayor riesgo de obesidad, DM2 e HTA. Se propone que la desnutrición, limita tanto el desarrollo como el crecimiento del feto, debido a que se pone en primer lugar el flujo sanguíneo hacia el cerebro, disminuyendo el flujo hacia otros tejidos, como el músculo, hígado, páncreas y riñones. Por tanto, se reduce la producción, la secreción y la sensibilidad a hormonas que favorecen el crecimiento fetal, como la insulina o los factores de crecimiento similares a insulina, y de esta forma se programa al feto respecto a la conservación de energía en la edad adulta.

En otros estudios desarrollados durante la hambruna holandesa de 1944, se observó que en la edad adulta de los hijos de las mujeres expuestas a la hambruna periconcepcional o durante el primer trimestre de la gestación, tenían un riesgo incrementado de desarrollar ECV y DM2. Además, otro estudio mostró un parámetro de metilación menor del factor similar a la insulina tipo 2 en los fetos que estuvieron expuestos a la hambruna en comparación a los no expuestos 60 años después.

En la dieta existen varios compuestos que se han relacionado con una capacidad de inducir o modificar las marcas epigenéticas caracterizadas por ser donadoras de grupos metilo, como la colina, la metionina, el ácido fólico, la betaina, vitamina B12, entre otros, además de otros factores como la ingestión deficiente o excesiva de calorías o proteínas, las dietas ricas en grasas saturadas o grasas trans, los ácidos grasos de cadena corta, los ácidos grasos poliinsaturados, algunos minerales, compuestos antioxidantes de origen vegetal, como las isoflavonas, los isotiocianatos, los polifenoles o las catequinas.

Perspectivas de la genómica nutricional

Los estudios de genómica nutricional que engloban tanto la nutrigenética como la nutrigenómica ofrecen conocimientos que actualmente son necesarios para fortalecer las bases en el desarrollo de la nutrición de precisión. De esta forma,

se busca que los estudios utilicen de manera prioritaria los diseños epidemiológicos que ofrezcan un nivel de evidencia científica mayor, debido a que, en la actualidad, la mayor parte de la información provista en el tema de la genómica nutricional viene de estudios de carácter observacional, mismos que se deben complementar con estudios de intervenciones dietéticas. Por otra parte, existe la desventaja de que los estudios de intervención dietética controlados y aleatorios a largo plazo son costosos de realizar y tienen una complejidad logística, pero en este punto, es el siguiente paso por realizar con un diseño epidemiológico adecuado y un nivel de evidencia mejorado.

Además, se espera que el costo de las pruebas de genotipificado disminuya, permitiendo una mayor accesibilidad a las pruebas genómicas y a la generación de nuevos diseños de paneles con las variantes más determinantes para cada población, ya que dependerá del tipo de población las variantes que más se relacionen con la respuesta de los individuos a ciertas características de la dieta.

Son necesarios más estudios que consideren variantes genéticas previamente estudiadas con prevalencias elevadas (> 15%), que influyan significativamente en la respuesta de los sujetos a los diferentes macro- y micronutrientes en la dieta. Asimismo, será importante la sensibilización y educación tanto para la población como para los profesionales de la salud acerca de la importancia de manejar estas herramientas de nutrición de precisión.

Referencias

- Bolton, J. L. y Bilbo, S. D. (2014). Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: Focus on inflammatory mechanisms. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 16(3), 307-320. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2014.16.3/jbolton>
- Chango, A. y Pogribny, I. P. (2015). Considering Maternal Dietary Modulators for Epigenetic Regulation and Programming of the Fetal Epigenome. *Nutrients*, 7(4), 2748-2770. <https://doi.org/10.3390/nu7042748>
- Corella, D., Coltell, O., Mattingley, G., Sorlí, J. V. y Ordovas, J. M. (2017). Utilizing nutritional genomics to tailor diets for the prevention of cardiovascular disease: A guide for upcoming studies and implementations. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 17(5), 495-513. <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1311208>

- Corella, D., Ordovás, J. M. y Corella, D. (2018). Papel de las ómicas en la nutrición de precisión: Fortalezas y debilidades. *Nutrición Hospitalaria*, 35(SPE4), 10-18. <https://doi.org/10.20960/nh.2119>
- De Toro-Martín, J., Arsenault, B. J., Després, J. P. y Vohl, M. C. (2017). Precision Nutrition: A Review of Personalized Nutritional Approaches for the Prevention and Management of Metabolic Syndrome. *Nutrients*, 9(8), 913. <https://doi.org/10.3390/nu9080913>
- Kaur, P., Shorey, L. E., Ho, E., Dashwood, R. H. y Williams, D. E. (2013). The Epigenome as a Potential Mediator of Cancer Prevention by Dietary Phytochemicals: The Fetus as a Target. *Nutrition reviews*, 71(7), 441-457. <https://doi.org/10.1111/nure.12030>
- Marti, A., Moreno-Aliaga, M. J., Zulet, M. A. y Martínez, J. A. (2005). Avances en nutrición molecular: Nutrigenómica y/o nutrigenética. *Nutrición Hospitalaria*, 20(3), 157-164.
- Martínez-López, E., García-García, M. R., Campos-Pérez, W. Y. y González-Becerra, K. (2013). Genómica nutricional: Conceptos y expectativas. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 21(1), 23-24.
- Ramos-López, O., Ojeda-Granados, C., Román, S. y Panduro, A. (2013). Influencia genética en las preferencias alimentarias. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 21(2), 74-83.
- Vesnina, A., Prosekov, A., Kozlova, O. y Atuchin, V. (2020). Genes and Eating Preferences, Their Roles in Personalized Nutrition. *Genes*, 11(4), 357. <https://doi.org/10.3390/genes11040357>

Papel de la farmacogenética y farmacogenómica en la medicina personalizada

Jorge Vergara Galicia

Introducción a la farmacogenética y farmacogenómica

Desde los orígenes de la medicina y la farmacología se sabe que las personas responden de manera diferente a los fármacos, ya que seguramente hemos tenido conocimiento alguna vez que una misma dosis de un medicamento que resulta efectiva en un paciente en otro no puede ser la idónea para alcanzar el mismo beneficio terapéutico, o incluso a llegar a causar reacciones adversas letales. Estas diferencias interindividuales en la respuesta a medicamentos pueden deberse a diversas causas: factores fisiológicos (función cardiovascular, estado psicológico, constitución genética, sexo, edad, índice de masa corporal, estado nutricional, embarazo y lactancia), factores patológicos (función inmunitaria, función digestiva, función hepática, función renal, tipo de patología, enfermedades concomitantes, polimedicación, estrés) y factores ambientales (exposiciones ocupacionales, tabaquismo, consumo de alcohol, ejercicio, dieta). Bajo este contexto, se estima que hasta en 30% de los casos, la variabilidad en la respuesta a los medicamentos se debe a la presencia de variantes genéticas denominadas polimorfismos. En este sentido, tanto la farmacogenética como la farmacogenómica estudian la posible relación entre la variabilidad genética y la respuesta a los fármacos. Si bien, estos términos se emplean indistintamente, existen matices entre ellos, los cuales a continuación elucidaremos.

El concepto de farmacogenética fue propuesto por primera vez por el famoso genetista estadounidense Arno Motulsky hace más de medio siglo en una época en la que ya empezaba a tenerse claro que la variación en la respuesta a los fármacos podía deberse, al menos en parte, a los efectos de la herencia genética. Posteriormente, Friedrich Vogel adoptó el concepto de fenogenética humana (parte de la genética que estudia los procesos que producen un determinado fenotipo a partir del genotipo durante el proceso ontogenético) y lo relacionó con la medicina en términos de los errores innatos del metabolismo, los genes y enzimas humanos, la importancia de nuevos métodos bioquímicos para el análisis fenogenético en humanos, el descubrimiento de los heterocigotos de las enfermedades hereditarias recesivas, tipos de sangre y enfermedades, enfoques de la farmacogenética humana y la terapia de enfermedades hereditarias. Después, apareció un flujo constante de informes que describían la contribución de la genética a la variación del efecto de los fármacos, donde la mayoría de ellos se referían a factores farmacocinéticos, es decir, factores que influyen en la concentración de fármaco que finalmente alcanzará al receptor farmacológico. En este sentido, de esos factores, el más importante fue la variación genética en la expresión y función de las enzimas metabolizadoras de fármacos, enzimas que pueden influir en los niveles de las concentraciones plasmáticas de los fármacos, generando diferencias en la eficacia y toxicidad de los medicamentos. Ejemplos de farmacogenética en la respuesta a fármacos incluyen el uso de enzimas del citocromo P450 (CYP450), que son responsables de metabolizar muchos fármacos en el hígado, variaciones genéticas en los receptores farmacológicos y genes implicados en su disposición, que también pueden afectar la respuesta a los fármacos. Por lo tanto, la farmacogenética se dedica a estudiar cómo la composición genética de un individuo afecta su respuesta a los medicamentos, siendo su objetivo optimizar el tratamiento a nivel individual ajustando las dosis, prediciendo y reduciendo el riesgo de reacciones adversas a los medicamentos, adaptando los tratamientos a cada paciente, generando ahorros de costos, prediciendo las respuestas a los medicamentos con base en información genética y generando una mejor satisfacción y calidad de vida del paciente.

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, el concepto de farmacogenética se acuñó en la década de 1950 y recogía la idea de que el efecto de las variantes

de gran tamaño del DNA contribuían de forma importante a la acción variable de los fármacos en un individuo. Sin embargo, el término farmacogenómica es utilizado actualmente para describir la idea de que múltiples variantes en todo el genoma, que difieren entre poblaciones, afectan a la respuesta de los fármacos. En este sentido, la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH), un consorcio mundial de agencias reguladoras, ha definido a la farmacogenómica como el estudio de las variaciones de las características del ADN y el ARN en relación con la respuesta a los medicamentos y a la farmacogenética como el estudio de las variaciones de la secuencia del ADN en relación con la respuesta a los medicamentos. Si bien la farmacogenética y la farmacogenómica comparten objetivos similares, difieren en su enfoque y alcance, ya que la farmacogenética hace referencia al ADN y la farmacogenómica estudia las bases moleculares y genéticas de las personas, incluyendo el ADN, el ARN y los productos de su expresión, así como su relación con la respuesta variable a los fármacos. Por lo tanto, la visión más integral que ofrece la farmacogenómica permite profundizar en el conocimiento de las bases moleculares y los mecanismos de las enfermedades con el objetivo de mejorar la comprensión sobre la manera en que interactúa un fármaco y el organismo. En este sentido, actualmente, la farmacogenómica desempeña un papel crucial en el descubrimiento, diseño y desarrollo de fármacos, ya que esto implica varias etapas, incluida la identificación del blanco terapéutico, la identificación del compuesto principal, las pruebas preclínicas y los ensayos clínicos. Por ejemplo, las variaciones en el ADN de la familia de enzimas hepáticas CYP 450 pueden afectar la descomposición de más de 30 clases diferentes de medicamentos (Genetic Alliance, 2009), por lo que comprender estas variaciones genéticas puede ayudar a los investigadores a identificar posibles objetivos farmacológicos y diseñar nuevas formulaciones que mejoren la eficacia de los medicamentos, reduzcan su toxicidad, así como adaptar la terapia, el tipo de fármaco y el régimen de dosificación a las características específicas de cada paciente. En relación a esto, los avances en farmacogenómica han dado lugar a mejoras significativas en el desarrollo de fármacos, tal es el caso del proyecto internacional HapMap en donde se está desarrollando un mapa de haplotipos del genoma humano que describe patrones comunes de variación genética en la población, el cual podrá ayudar a los investigadores a identificar variaciones genéticas que pueden afectar la respuesta a los medicamentos y diseñar medicamentos que sean más efectivos para poblaciones

específicas. Por lo tanto y de cara al futuro, la farmacogenómica tiene el potencial de revolucionar el desarrollo de fármacos y de transformar la forma en que se prescriben los medicamentos, lo que en última instancia conducirá a mejores resultados de salud para los pacientes.

Variabilidad genética y respuesta a los medicamentos

La variabilidad humana en la respuesta a los fármacos se ha atribuido a diversos factores potenciales, tanto fisiológicos (edad, sexo, etnia, peso corporal, función hepática y renal), ambientales (ingesta dietética, administración concomitante de fármacos, exposición a determinadas sustancias químicas) como genéticos (procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos). En consecuencia, la respuesta de los pacientes a los medicamentos es muy variable y esta se observa no solo en las respuestas beneficiosas, sino también en las reacciones adversas a los medicamentos, un problema cada vez más reconocido que cobra un elevado número de vidas y costos sanitarios; por lo tanto, el principal objetivo de la terapéutica moderna es seleccionar los fármacos más eficaces y menos nocivos para el paciente a través del reconocimiento de la contribución genética en la variabilidad de la acción de los fármacos. En este sentido, es bien conocido que la eficacia de un fármaco y las reacciones adversas que puede inducir están en función de la dosis y/o ventana terapéutica (una dosis alta incrementa el efecto terapéutico del fármaco, pero al mismo tiempo aumenta la predisposición a nuevos o mayores efectos secundarios indeseables) y determinan el resultado clínico de un medicamento, razón por la cual para muchos fármacos y sobre todo aquellos con ventana terapéutica estrecha, la dosis óptima necesaria para un tratamiento eficaz y seguro varía significativamente de un paciente a otro. Un ejemplo claro de ello es la warfarina, un anticoagulante fundamental para el tratamiento de enfermedades tromboembólicas que tiene un rango de dosis terapéuticas muy estrecho y efectos secundarios potencialmente mortales, razón por la que es obligatorio realizar pruebas de coagulación sanguínea frecuentemente a los pacientes que reciben tratamiento con warfarina para lograr una anticoagulación eficaz y segura. El uso clínico de la simvastatina

(estatina de la clase de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa) para reducir el nivel de colesterol en sangre es otro ejemplo que demuestra las grandes variaciones individuales y dependientes de la dosis en la eficacia y la seguridad de los fármacos; esto se reflejó en un estudio de 156 sujetos con niveles de colesterol LDL mayor a 160 mg/dL, los cuales fueron sometidos a un tratamiento con esta estatina y se logro reducir los niveles de LDL hasta en 53%, no obstante el 5% de los sujetos presentaron una reducción escasa o nula, además de que causó toxicidad hepática y muscular en un pequeño número de sujetos. En este sentido, estudios recientes han sugerido que los polimorfismos genéticos de la HMG-CoA reductasa y los transportadores de fármacos, los cuales, regulan la captación o el eflujo hepático de las estatinas y sus metabolitos, contribuyen a la variabilidad de la eficacia y los efectos secundarios de los fármacos reductores del colesterol.

Los factores genéticos y no genéticos afectan a la variabilidad individual de la respuesta a un fármaco, modulando la eficacia y toxicidad de los fármacos en los pacientes. En este sentido, los factores genéticos suelen provocar cambios permanentes en las funciones de las proteínas, mientras que los factores ambientales y fisiológicos y su impacto en la respuesta a los fármacos son transitorios en la mayoría de los casos. En el primer caso, las variaciones individuales son estables a lo largo de la vida y se heredan por transmisión germinal, pero una respuesta farmacológica modulada por un factor no genético suele volver a su estado normal tras la corrección o eliminación del factor. Por ejemplo, polimorfismos genéticos de las proteínas responsables de interactuar con los fármacos o de las que llevan a cabo su biotransformación y transporte son las fuentes más importantes de variabilidad individual en la eficacia y seguridad de los fármacos; no obstante, es importante mencionar que las variaciones genéticas pueden deberse también a la inserción, delección o duplicación de secuencias de ADN. En relación con ello, a nivel molecular, las variaciones genéticas pueden modificar la estructura de una proteína diana a través de mutaciones en la región codificante del gen o la cantidad de proteína expresada, modulando la regulación génica, lo que en última instancia altera la función de la proteína o las constantes de velocidad y cinética en el caso de una enzima; también, es importante mencionar que las mutaciones pueden modular la expresión génica mediante regulación epigenética. Por otra parte, es bien conocido que las sustancias químicas ambientales, fármacos administrados concomitantemente, componentes dietéticos, el tabaquismo y el consumo de alcohol inducen o inhiben la expresión

del complejo enzimático del citocromo P450, lo cual hace que se altere la eficacia de los fármacos, se induzcan interacciones fármaco-fármaco y efectos secundarios. Además, factores fisiológicos (edad, sexo, estados patológicos, embarazo, ejercicio, inanición, entre otros) también pueden contribuir significativamente a las variaciones individuales de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los fármacos administrados. En conclusión, la variabilidad genética puede afectar la respuesta a los medicamentos de varias maneras, por ejemplo, a través del metabolismo en donde algunos genes codifican para enzimas que participan en el metabolismo de los medicamentos y la variabilidad genética puede afectar la cantidad de enzimas producidas o su actividad, lo que a su vez puede influir en la velocidad y eficacia del metabolismo de los medicamentos; el transporte, donde algunos genes codifican para proteínas que transportan los medicamentos a través de la membrana celular, puede afectar la cantidad o actividad de estas proteínas, lo que puede influir en la entrada y salida de los medicamentos de las células; los receptores, donde algunos medicamentos actúan a través de la unión a receptores específicos en las células, puede afectar la cantidad o afinidad de los receptores, lo que puede influir en la respuesta a los medicamentos; proteínas asociadas con la respuesta a los medicamentos, donde proteínas que están involucradas en la respuesta a los medicamentos, por ejemplo, en la activación de cascadas de señalización celular, puede afectar la cantidad o actividad de estas proteínas, lo que puede influir en la respuesta a los medicamentos. Por lo tanto, la variabilidad genética puede afectar la respuesta a los medicamentos de diferentes maneras y es importante tener en cuenta estas diferencias al elegir y administrar medicamentos.

Interrelación entre genética, farmacocinética y farmacodinamia

La farmacocinética es la rama de la farmacología que se enfoca en cómo el cuerpo procesa y elimina los medicamentos. La genética juega un papel importante en la farmacocinética, ya que la variabilidad genética puede afectar la forma en que el cuerpo procesa y elimina los medicamentos. Algunos ejemplos de cómo la variabilidad genética puede afectar la farmacocinética incluyen:

- ♦ **Metabolismo:** algunos genes codifican para enzimas que participan en el metabolismo de los medicamentos. La variabilidad genética puede afectar la cantidad de enzimas producidas o su actividad, lo que a su vez puede influir en la velocidad y eficacia del metabolismo de los medicamentos.
- ♦ **Transporte:** algunos genes codifican para proteínas que transportan los medicamentos a través de la membrana celular. La variabilidad genética puede afectar la cantidad o actividad de estas proteínas, lo que puede influir en la entrada y salida de los medicamentos de las células.
- ♦ **Eliminación:** algunos genes codifican para proteínas que participan en la eliminación de los medicamentos del cuerpo. La variabilidad genética puede afectar la cantidad o actividad de estas proteínas, lo que puede influir en la velocidad y eficacia de la eliminación de los medicamentos.

Esto lo podemos ver reflejado con los inhibidores de la hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa, conocidos como estatinas, los cuales se utilizan ampliamente como tratamiento principal de la dislipidemia. Las estatinas se consideran eficaces y seguras, pero tienen efectos secundarios, y la toxicidad para el músculo esquelético es el más común. La miotoxicidad se considera un efecto secundario dependiente de la exposición a las estatinas, que provoca un amplio espectro de trastornos que van desde mialgias leves hasta rabdomiólisis potencialmente letal, por lo tanto, el riesgo de este efecto secundario aumenta con la afectación de la farmacocinética de las estatinas y la posterior acumulación de ellas o sus metabolitos. En este sentido, los polimorfismos genéticos en el gen de la enzima metabolizadora y transportadora de las estatinas afectan su farmacocinética y pueden ser responsables de las diferencias individuales en el tratamiento con estatinas. Por ejemplo, la atorvastatina y la lactona de atorvastatina son metabolizadas principalmente por el CYP3A4, aunque no se han identificado polimorfismos funcionales frecuentes en el gen CYP3A4; sin embargo, la captación hepática de la atorvastatina por los transportadores es importante para la tasa de excreción del fármaco. OATP1B1 es un transportador de captación (codificado por el gen SLCO1B1) que se expresa exclusivamente en el lado sinusoidal de los hepatocitos y es responsable de la captación hepática de fármacos (incluida la atorvastatina) y compuestos endógenos procedentes de la sangre. La mayoría de los ensayos

clínicos sobre la atorvastatina se han centrado en los polimorfismos genéticos del gen *SLCO1B1*, donde se han identificado más de 40 variantes no sinónimas y estudiado principalmente dos polimorfismos de nucleótido único como *SLCO1B1*521T>C (rs4149056) y 388A>G (rs2306283). En relación con ello, en un estudio clínico, en *SLCO1B1*521T>C (rs4149056) la concentración plasmática del genotipo T/C o C/C fue 40-81% superior al del genotipo T/T, lo cual está directamente relacionado con un estudio in vitro que demostró que *SLCO1B1* 521T>C (rs4149056) reduce la actividad de transporte de la atorvastatina al regular a la baja la expresión de OATP1B1 en la membrana plasmática, causando un aumento de las concentraciones plasmáticas al reducir la captación de atorvastatina en el hígado. De igual forma, todo esto se ha demostrado en varios estudios en donde se reporta que la concentración plasmática de la atorvastatina es 69% y 53% mayor en sujetos japoneses y chinos, respectivamente, que en caucásicos. De igual forma, el metabolismo oxidativo de la simvastatina está mediado principalmente por CYP3A4 y CYP3A5. Pocos estudios han investigado el efecto de los polimorfismos de los genes CYP3A4 y CYP3A5 en la respuesta de los pacientes al tratamiento con estatinas, pero un estudio sugiere que CYP3A5*3 (polimorfismo de un único nucleótido) aumenta el efecto de la simvastatina en caucásicos; además, otro estudio recientemente ha reportado que el CYP3A5*3 incrementa la concentración plasmática de la simvastatina en aproximadamente 60%. Por lo tanto, los polimorfismos genéticos dan lugar a una expresión mutacional de las isoenzimas CYP y de proteínas transportadoras de fármacos, los cuales contribuyen a las diferencias individuales en la farmacocinética de las estatinas.

Por otra parte, la farmacodinamia es la rama de la farmacología que se enfoca en cómo los medicamentos interactúan con el cuerpo y producen sus efectos terapéuticos. La genética también puede afectar la farmacodinamia, es decir, cómo los medicamentos interactúan con el cuerpo y producen sus efectos. Algunos ejemplos de cómo la variabilidad genética puede afectar la farmacodinamia incluyen:

- ♦ **Receptores:** algunos medicamentos actúan a través de la unión a receptores específicos en las células. La variabilidad genética puede afectar la cantidad o afinidad de los receptores, lo que puede influir en la respuesta a los medicamentos.

- ♦ Proteínas asociadas con la respuesta a los medicamentos: algunas proteínas están involucradas en la respuesta a los medicamentos, por ejemplo, en la activación de cascadas de señalización celular. La variabilidad genética puede afectar la cantidad o actividad de estas proteínas, lo que puede influir en la respuesta a los medicamentos.
- ♦ Eficacia: la variabilidad genética puede afectar la forma en que los medicamentos interactúan con el cuerpo y, por lo tanto, su eficacia. Por ejemplo, algunos pacientes pueden metabolizar los medicamentos más rápidamente de lo que se espera, lo que puede resultar en una menor concentración del medicamento en el cuerpo y, por lo tanto, una menor eficacia.

Un ejemplo de ello es la variación genética que contribuye a la variabilidad interindividual tanto de la percepción del dolor como en la respuesta analgésica. En este sentido, de los estudios que han investigado la farmacogenética de los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), la mayoría han evaluado el efecto de las variantes en el citocromo P450 (CYP) 2C8 (CYP2C8*2, CYP2C8*3 y CYP2C8*4) y CYP2C9 (CYP2C9*2 y CYP2C9*3) sobre la exposición y el aclaramiento de los AINEs, ya que estas enzimas están implicadas en el metabolismo de muchos fármacos de esta clase. No obstante, pocos estudios han investigado los efectos de la variación genética de los receptores farmacológicos, COX-1 (PTGS1) y COX-2 (PTGS2), sobre la respuesta bioquímica a los AINEs. Las variantes más estudiadas en PTGS1 son Pro17Leu (rs3842787) y -842A > G (rs1036114), las cuales se encuentran en completo desequilibrio tanto en poblaciones caucásicas como afroamericanas y se ha informado que los individuos portadores de estas variantes son más sensibles, menos sensibles o igual de sensibles a la aspirina, en comparación con los individuos sin las variantes. Por otra parte, estudios *in vitro* conducentes a la caracterización funcional de enzimas COX-1 mutantes han sugerido que la variación genética puede incluso afectar a la sensibilidad de diversos AINEs.

Por lo tanto, es importante tener en cuenta la genética al considerar la farmacocinética y farmacodinamia de un medicamento, ya que puede afectar la forma en que el cuerpo lo procesa y elimina y la forma en que interactúa con el cuerpo y produce su efecto terapéutico, todo ello con la finalidad de

predecir cómo un paciente puede responder a un medicamento en particular y personalizar la terapia farmacológica para mejorar la eficacia y seguridad del tratamiento.

Pruebas genéticas para la farmacogenética

Las pruebas genéticas para la farmacogenética son herramientas valiosas para ayudar a predecir cómo un paciente puede responder a un medicamento en particular. En este sentido, los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) de Estados Unidos de Norteamérica definen las pruebas genéticas como un análisis de cromosomas, genes o proteínas humanas con el fin de detectar enfermedades hereditarias con fines clínicos. Sin embargo, a pesar de que las pruebas genéticas se han utilizado tradicionalmente para el cribado prenatal, el cribado de portadores de un trastorno genético con fines reproductivos y el diagnóstico de trastornos mendelianos raros sospechados a partir de pruebas clínicas o antecedentes familiares, con el campo emergente de la farmacogenética/farmacogenómica, se han propuesto pruebas genéticas para guiar la terapia farmacológica con el fin de mejorar la eficacia de los medicamentos o evitar sus efectos adversos. En relación con esto, las recomendaciones del Consorcio de Implementación de Farmacogenética Clínica (CPIC) se centran en los pares gen-fármaco para las pruebas genéticas aprobadas por el programa de las Enmiendas para el Mejoramiento de Laboratorios Clínicos (CLIA) que muestran evidencias de la necesidad de cambiar la dosis del fármaco o considerar un fármaco alternativo. Es importante mencionar que el proceso de secuenciación e interpretación debe estar acreditada por el Colegio Americano de Patólogos. Algunos ejemplos de pruebas genéticas utilizadas en la farmacogenética incluyen:

- ♦ Pruebas genéticas para guiar la dosis de fármacos: las variantes genéticas pueden alterar el metabolismo de los fármacos y, por tanto, es necesario orientar los ajustes de dosis de los medicamentos para evitar un tratamiento insuficiente o efectos secundarios derivados de una elevada exposición a los mismos. Por ejemplo, la warfarina (anticoagulante oral) ampliamente utilizado para la prevención y el tratamiento de trastornos tromboembólicos, presenta una gran variabilidad interindividual en la dosificación para alcanzar el rango terapéutico, la cual está relacionada tanto con factores die-

téticos como genéticos. Además, esto adquiere mayor relevancia debido a que tiene un estrecho margen terapéutico, razón por la cual el CPIC recomienda actualmente la realización de pruebas para detectar variantes genéticas en genes relacionados con el metabolismo de la warfarina (CYP2C9), la enzima diana para la acción de la warfarina (VKORC1) y en vías relacionadas con el reciclado de la vitamina K (CYP4F2) para orientar la dosificación de la warfarina. En relación con ello, se dispone de pruebas genéticas para CYP2C9*2 y CYP2C9*3 (más comunes en la ascendencia europea; CYP2C9*2 está ausente en los asiáticos), CYP2C9*5, CYP2C9*6, CYP2C9*8 y CYP2C9*11 (más comunes en la ascendencia africana) y CYP4F2*3.

- ♦ Pruebas genéticas para orientar la elección de fármacos: las pruebas genéticas pueden ayudar a tomar decisiones sobre el tratamiento al identificar la sensibilidad o resistencia a los fármacos utilizados para la enfermedad tratada (eficacia farmacológica). Por ejemplo, el ivacaftor es un fármaco aprobado por la FDA para la fibrosis quística que regula la actividad del canal regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), que ha demostrado mejorar la función pulmonar en ensayos clínicos. Actualmente, se conoce que aproximadamente el 85-90% de los individuos de ascendencia europea con fibrosis quística son portadores de al menos una copia de la variante F508del, que es una variante funcional que da lugar a una proteína CFTR anormal, además de que los individuos portadores de dos copias de la mutación CFTR F508del no muestran mejoría de los síntomas clínicos ni de la función pulmonar tras el tratamiento con ivacaftor, razón por lo que generalmente se recomienda un tratamiento alternativo para estos pacientes, por lo tanto, las directrices actuales recomiendan realizar pruebas genéticas de las variantes de CFTR antes de iniciar el tratamiento con ivacaftor.
- ♦ Pruebas genéticas para evitar efectos idiosincrásicos de los medicamentos: las reacciones adversas a los medicamentos (RAMs) pueden provocar morbilidad y, en casos graves, mortalidad, y pueden contribuir a la falta de adherencia al tratamiento farmacológico. Algunas RAMs con susceptibilidad genética subyacente (por ejemplo, síndrome de Stevens-Johnson, necrólisis epidérmica tóxica y enfermedad hepática inducida por fármacos) pueden prevenirse mediante pruebas genéticas. Por ejemplo, las pruebas genéticas

ya forman parte integral del uso de algunos agentes antirretrovirales en la gestión de la atención clínica del VIH en Estados Unidos de Norteamérica. Por lo general, el abacavir se tolera bien; sin embargo, puede provocar una reacción de hipersensibilidad mediada inmunológicamente por la activación de HLA-B*57:01 (variación genética que se asocia con una mayor probabilidad de hipersensibilidad al abacavir). Las reacciones de hipersensibilidad al abacavir relacionadas con HLA-B*57:01 se producen en el 3-5% de los pacientes durante las primeras 6 semanas de tratamiento, por lo tanto, en la actualidad, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) recomienda realizar pruebas de detección del alelo HLA-B*57:01 antes de iniciar un tratamiento antivírico que incluya abacavir.

El Registro de Pruebas Genéticas (GTR) desarrollado por los NIH es un registro que incluye pruebas genéticas y servicios de pruebas genéticas, así como información sobre la finalidad, metodología, validez y utilidad de la prueba, los contactos y certificados de los laboratorios. En este sentido, los datos más recientes de GTR muestran alrededor de 54 290 pruebas para 16 406 genes y 10 974 padecimientos realizadas por 509 laboratorios.

Finalmente, es importante tener en cuenta que las pruebas genéticas para la farmacogenética son solo una parte de la evaluación de la respuesta a los medicamentos, por lo que es necesario considerar otros factores, como la edad, el peso, la enfermedad y otros medicamentos que el paciente esté tomando. Además, es importante tomar en consideración que a pesar de que actualmente se cuenta con un número considerable de pruebas genéticas, se están investigando nuevas y se están mejorando las pruebas existentes para proporcionar resultados más precisos y útiles en la práctica clínica, por lo que los resultados de estas pruebas deben interpretarse con cuidado y en conjunto con otra información clínica.

Aplicaciones clínicas de la farmacogenética

Muchos de los fármacos disponibles actualmente en el mercado son en su mayoría para tratar un padecimiento en específico, pero su uso diario demuestra que la respuesta clínica puede variar mucho de un paciente a otro, por lo que se requiere

el uso de enfoques personalizados, como el monitoreo terapéutico de los medicamentos (TDM), sobre todo de aquellos medicamentos caracterizados por un índice terapéutico estrecho. El TDM se define como la medición en el laboratorio clínico de un parámetro químico que, con una interpretación médica adecuada, influirá directamente en los procedimientos de prescripción de medicamentos (Haufrond y Picard, 2019). La mayoría de las veces, la TDM convencional se refiere a la individualización de la dosis del fármaco mediante el mantenimiento de las concentraciones plasmáticas del fármaco dentro de un rango terapéutico deseado y, de este modo, se propone al médico una dosis individualizada en función de la concentración plasmática del fármaco mediante un enfoque a posteriori. En este sentido, hace más de 20 años, los laboratorios clínicos empezaron a proponer el uso de la farmacogenética como herramienta complementaria para optimizar la eficacia de los fármacos, de tal manera que este consenso está siendo utilizado actualmente como una herramienta adicional para afinar la selección de dosis o, lo que es más interesante, para seleccionar, a priori, la primera dosis a administrar. Por lo tanto, la farmacogenética y, por extensión, la farmacogenómica combinan la farmacología y la genética/genómica (como estudio de los genes y sus funciones) para desarrollar medicamentos eficaces y seguros y proponer una dosificación de fármacos (como principal aplicación relacionada con la TDM) que se adapte a la composición genética de una persona para conseguir la mejor respuesta clínica con una alta eficacia terapéutica y una baja aparición de RAMs. Por ejemplo, varios de los servicios de pruebas farmacogenéticas informan los resultados de las pruebas en términos de fenotipos metabolizadores extensos (EM), intermedios (IM), pobres (PM) o ultrarrápidos (UM). Estos términos se refieren a fenotipos metabólicos definidos por combinaciones alélicas, donde el fenotipo EM suele consistir en dos alelos funcionales, cada uno de los cuales codifica una enzima CYP plenamente funcional; por su parte, el fenotipo IM surge de un alelo funcional y otro no funcional, y en la mayoría de los casos muestra una actividad enzimática CYP normal o ligeramente reducida; por otro lado, el fenotipo PM son individuos que tienen dos alelos no funcionales. En consecuencia, si se prescribe un medicamento que se metaboliza por la enzima afectada, es probable que los PM tengan una concentración plasmática del fármaco superior a la esperada, lo que a menudo provocaría efectos secundarios de la medicación, y si se tratara de un profármaco, mostrarían una falta de eficacia. Por otra parte,

los UM poseen una duplicación de un gen CYP o son portadores de una variante genética que aumenta la tasa de metabolismo del fármaco por la enzima codificada, por lo que si se les prescribe un medicamento que se metaboliza por esa enzima, puede tener una concentración reducida del fármaco en el plasma, lo que podría hacer que el medicamento fuera ineficaz a dosis regulares y si se tratara de un profármaco, podrían producirse efectos tóxicos. Por esta razón, por ejemplo, la FDA ha publicado una tabla de biomarcadores farmacogenómicos, que incluye recomendaciones de dosificación específicas para varios genotipos del CYP450 de varios fármacos cuando estos se prescriben a EM, IM, PM y UM.

Por lo tanto y tomando en consideración lo anterior, las aplicaciones clínicas de la farmacogenética incluyen:

- ♦ Selección de medicamentos: puede ayudar a los médicos a elegir el mejor medicamento para un paciente individual, basado en su genética y su historial médico. Esto puede mejorar la eficacia de los medicamentos y reducir el riesgo de efectos secundarios.
- ♦ Dosis personalizadas: también puede ayudar a los médicos a determinar la dosis óptima de un medicamento para un paciente individual, basado en su genética y su historial médico. Esto puede mejorar la eficacia de los medicamentos y reducir el riesgo de efectos secundarios.
- ♦ Prevención de reacciones adversas: puede identificar pacientes que están en mayor riesgo de reacciones adversas a ciertos medicamentos. Esto permite a los médicos tomar medidas para prevenir estas reacciones, como cambiar a un medicamento diferente o ajustar la dosis.
- ♦ Tratamiento de enfermedades con genética compleja: algunas enfermedades, como la enfermedad cardíaca, la diabetes y la enfermedad hepática, están influenciadas por múltiples genes. La farmacogenética puede ayudar a los médicos a comprender cómo la genética de un paciente individual influye en su respuesta a los medicamentos y a seleccionar el mejor tratamiento para su enfermedad.

Finalmente, es importante tener en cuenta que la farmacogenética es solo una parte de la evaluación de la respuesta a los medicamentos y que los médicos deben considerar otros factores, como la edad, el peso, la enfermedad y otros medicamentos que el paciente esté tomando, para predecir adecuadamente

la respuesta a los medicamentos. Además, hay que recordar que la farmacogenética es una tecnología en desarrollo y sus aplicaciones clínicas aún están siendo investigadas y mejoradas para proporcionar resultados más precisos y útiles en la práctica clínica.

Desafíos y limitaciones de la farmacogenética

Aunque la farmacogenética tiene un gran potencial para mejorar la eficacia y seguridad de los medicamentos, también existen algunos desafíos y limitaciones que deben ser considerados. Por ejemplo, algunos de los retos relacionados con la adopción de pruebas genéticas para el diagnóstico y tratamiento de pacientes son la falta de validez y utilidad clínica demostrada de algunas variantes genéticas y la existencia de otras alternativas menos costosas. En este sentido, los esfuerzos deberán centrarse en un mayor acceso a la información para los médicos a través de la educación sobre la disponibilidad de las pruebas, la interpretación y las acciones clínicas recomendadas basadas en los resultados, incluyendo la existencia de las guías existentes del CPIC y/o de las sociedades científicas. También se ha planteado la preocupación por la seguridad de los pacientes debido a la solicitud incorrecta de pruebas, la interpretación errónea y la falta de seguimiento de los resultados, por lo que la incorporación de las pruebas genéticas a las historias clínicas electrónicas facilitaría la toma de decisiones clínicas basadas en la genética.

Por otra parte, muchas enfermedades o algunos elementos de ellas son poligénicas, es decir, están influidas por múltiples genes, lo cual hace pensar que las pruebas de panel genético que incluyen varias variantes pueden ser más eficientes para su uso en el tamizaje y diagnóstico de enfermedades genéticas. Con relación a esto y dado que la prevalencia de las variantes varía en las poblaciones de origen y que algunas variantes pueden ser raras en algunos grupos étnicos, las pruebas genéticas serán probablemente más rentables, si se dirigen a pacientes de un grupo racial/étnico con una alta prevalencia de la variante; por ejemplo, el alelo HLA-B*57:01 relacionado con la toxicidad del abacavir es común que esté presente en individuos de ascendencia europea (frecuencia alélica del 8%), pero poco frecuente en individuos de ascendencia africana (0.3%).

De igual forma, la implantación de las pruebas genéticas en la atención clínica requerirá la creación de un proceso sencillo para solicitar pruebas genéticas en hospitales y clínicas, así como el acceso a expertos que aborden las preocupaciones éticas, legales, comunitarias, de pacientes y familiares, además de información sobre el costo y si entran dentro de la cobertura de algún seguro. Actualmente, algunos de los retos sobre la implementación de las pruebas genéticas se están analizando en la red de trabajo sobre la Aplicación Práctica de la GeNómica (IGNITE) que es financiada por los NIH.

Finalmente, las conversaciones con los pacientes y las familias deben adaptarse a la finalidad específica para la que se solicita la prueba genética (diagnóstico, predicción, tamizaje) y guiarse por la información sobre riesgos y beneficios en estos contextos. En relación con esto, los temas que deberán ser incluidos en dichas conversaciones deben admitir la discusión sobre si los resultados genéticos alterarán el tratamiento clínico del paciente o proporcionarán información importante para el cuidado del paciente o de los miembros de la familia que puedan ser portadores de la mutación genética, así como opciones alternativas a las pruebas genéticas y sus costos. Es importante mencionar que, actualmente, se recomienda a los pacientes y familiares la contratación de un asesor genético tanto antes de solicitar la prueba como cuando se disponga de los resultados de la misma, ya que estos están familiarizados con los procedimientos técnicos de las pruebas y la interpretación de los resultados, y tienen amplia experiencia en asesoramiento a las familias y en la respuesta a las preocupaciones de los pacientes.

Por lo tanto, es importante seguir investigando y mejorando la farmacogenética para superar estos desafíos y limitaciones y para proporcionar una mejor comprensión de la respuesta a los medicamentos y cómo la genética influye en ella. A medida que se desarrolla la tecnología y se acumula más información, se espera que la farmacogenética se convierta en una herramienta valiosa para la toma de decisiones clínicas y para mejorar la eficacia y seguridad de los medicamentos.

Futuro de la farmacogenética

Más de setenta años de desarrollo metodológico han llevado a la farmacogenética a transformarse de una ciencia emergente en un área interdisciplinar

de investigación clave para la implantación de la medicina personalizada, a través de la inclusión de la genética en las respuestas farmacológicas mediante ensayos aleatorios controlados para estudiar diversos genes implicados en dichas respuestas. También, es importante mencionar que la finalización del Proyecto Genoma Humano desencadenó la transición a la farmacogenómica debido a que las tecnologías de secuenciación que se utilizaron en dicho proyecto permitieron determinar el campo de aplicación de la farmacogenética, mientras que las herramientas de edición genómica permitieron descubrir y validar funcionalmente el campo de aplicación de la farmacogenética. De igual forma, las herramientas y conceptos de la estadística y la informática han sido y serán clave para analizar e integrar conjuntos de datos cada vez más complejos, acercándonos un paso más al estudio *in silico* de la fármaco-ómica. No obstante, a pesar de los indiscutibles avances, quedan numerosos retos por delante. En este sentido, debido a su naturaleza interdisciplinaria, el progreso de la farmacogenética podrá lograrse a través de diferentes vías (generación de datos, análisis e integración de datos, priorización y validación de descubrimientos), ya que el tamaño y la diversidad de la información contenida en los biobancos aumentan constantemente, a medida que el desarrollo de las tecnologías de secuenciación y ómicas mejoran la comprensión de las vías genéticas y moleculares, y las historias clínicas electrónicas amplían su caracterización clínica. Aunado a lo anterior, las pruebas de alto rendimiento en líneas celulares modificadas genéticamente, organoides derivados de pacientes y modelos orgánicos podrán evaluar el impacto de las variaciones genéticas en entornos controlados y ajustables. Por lo tanto, el establecimiento de soluciones eficientes y seguras para el almacenamiento y el intercambio de datos fomentará el desarrollo de enfoques estadísticos y de algoritmos de aprendizaje automático destinados a analizar e integrar datos procedentes de diversas fuentes para tener una mejor comprensión de la arquitectura genética y de su implicación en la eficacia y seguridad de los medicamentos.

Sin duda, es probable que los ensayos aleatorios controlados sigan desempeñando un papel importante en la aplicación clínica de la farmacogenética, pero será importante maximizar su tasa de éxito y mejorar su rendimiento, lo cual permita promover el desarrollo de diagnósticos complementarios que midan la idoneidad de un tratamiento para un paciente en particular. Sin embargo, en la

actualidad, la investigación genética y genómica sigue realizándose predominantemente en poblaciones de ascendencia europea, pese al consenso general sobre la necesidad de una mayor diversidad para comprender el genoma humano, razón por la cual las soluciones a los retos mencionados anteriormente deben garantizar que los avances en la farmacogenética beneficien a todos. De igual forma, aunque buena parte de los sistemas sanitarios carecen de la infraestructura necesaria para llevar a cabo el tamizaje de variantes farmacogenéticas, la prescripción cada vez más guiada genéticamente junto con el registro de los resultados en las historias clínicas electrónicas impulsará la investigación y al tiempo, ayudará a perfeccionar las pautas de prescripción. Por lo tanto, como puede observarse, el futuro de la farmacogenética es muy prometedor y con un gran potencial para mejorar la eficacia y seguridad de los medicamentos, por lo que se espera que continúe evolucionando y mejorando con el objetivo de proporcionar una atención médica más personalizada y jugando un papel cada vez más importante en la atención clínica y en la toma de decisiones sobre el tratamiento.

Referencias

- Auwerx, C., Sadler, M. C., Reymond, A. y Kutalik, Z. (2022). From pharmacogenetics to pharmaco-omics: Milestones and future directions. *Human Genetics and Genomics Advances*, 3(2). <https://doi.org/10.1016/j.xhgg.2022.100100>
- Baskys, A. (2019). Application of pharmacogenetics in clinical practice: problems and solutions. *Journal of Neural Transmission*, 126(1), 109-113). <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1894-0>
- Cacabelos, R., Cacabelos, N. y Carril, J. C. (2019). The role of pharmacogenomics in adverse drug reactions. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 12(5), 407-442. <https://doi.org/10.1080/17512433.2019.1597706>
- Corno, A., García, P. y Soria, A. (2018). Teaching of Pharmacogenetics, Pharmacogenomics and Genetics in Spanish Pharmacy Faculties; causes of delay. *Educación Médica*, 19, 203-210. <https://doi.org/10.1016/j.edumed.2017.03.029>
- Franceschini, N., Frick, A. y Kopp, J. B. (2018). Genetic Testing in Clinical Settings. *American Journal of Kidney Diseases*, 72(4), 569-581. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2018.02.351>

- Genetic Alliance-The New York-Mid-Atlantic Consortium for Genetic and Newborn Screening Services (2009). *Cómo entender la genética: Una guía para pacientes y profesionales médicos en la región de Nueva York y el Atlántico Medio*. Genetic Alliance. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK132207/>
- Haufroid, V. y Picard, N. (2019). *Pharmacogenetics Biomarkers Predictive of Drug Pharmacodynamics as an Additional Tool to Therapeutic Drug Monitoring*.
- Hirota, T., Fujita, Y. e Ieiri, I. (2020). An updated review of pharmacokinetic drug interactions and pharmacogenetics of statins. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 16(9), 809-822. <https://doi.org/10.1080/17425255.2020.1801634>
- Koo, S. H. y Lee, E. J. (2006). Pharmacogenetics approach to therapeutics. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 33(5-6), 525-532. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04402.x>
- Ma, Q. y Lu, A. Y. H. (2011). Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and individualized medicine. *Pharmacological Reviews*, 63(2), 437-459. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003533>
- Madden, E. B., Lockhart, N. C. y Volpi, S. (s. f.). *Implementing genomics in practice (IGNITE)*. <https://www.genome.gov/Funded-Programs-Projects/Implementing-Genomics-in-Practice-IGNITE>
- Ndadza, A., Thomford, N. E., Mukanganyama, S., Wonkam, A., Ntsekhe, M., & Dandara, C. (2019). The Genetics of Warfarin Dose-Response Variability in Africans: An Expert Perspective on Past, Present, and Future. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 23(3), 152-166. <https://doi.org/10.1089/omi.2019.0018>
- Roden, D. M. y George, A. L. (2002). The genetic basis of variability in drug responses. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(1), 37-44). <https://doi.org/10.1038/nrd705>
- Roden, D. M., McLeod, H. L., Relling, M. V., Williams, M. S., Mensah, G. A., Peterson, J. F. y Van Driest, S. L. (2019). Pharmacogenomics. *The Lancet*, 394(10197), 521-532). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31276-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31276-0)
- Saunders, H., Harris, D. y Chirilă, R. M. (2020). Pharmacogenomics: introduction and use in clinical practice. *Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de médecine interne*, 58(2), 69-74). <https://doi.org/10.2478/rjim-2020-0001>
- Tafazoli, A., Guchelaar, H. J., Miltzyk, W., Kretowski, A. J. y Swen, J. J. (2021). Applying Next-Generation Sequencing Platforms for Pharmacogenomic Testing in Clinical Practice. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.693453>

- Theken, K. N. (2018). Variability in analgesic response to non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 139, 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2018.10.005>
- Vogel, F. (1959). II. Moderne Probleme der Humangenetik. En L. Heilmeyer, R. Schoen, B. de Rudder (Eds.). *Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde. Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde*, vol 12. Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-94744-5_2
- Weinshilboum, R. M. y Wang, L. (2017). Pharmacogenomics: Precision Medicine and Drug Response. *Mayo Clinic Proceedings*, 92(11), 1711-1722. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.09.001>

Organismos transgénicos con aplicación en la medicina

Adriana María Salazar Montes
Eva Solís Sta

Francisco Antonio Guillermo Mateos Ramírez
Luis Daniel Hernández Ortega

Introducción

Los organismos transgénicos son organismos genéticamente modificados por la incorporación de uno o más genes exógenos a su genoma. Organismos a los que se les han destruido uno o más de sus genes también son considerados transgénicos. Se pueden realizar cualquier tipo de combinaciones, es decir, adicionar un gen de una planta a otra planta de una especie diferente, gen de una planta a un animal, gen de un animal a una planta, gen de un animal a otro animal de diferente especie, de un animal o planta a una bacteria, superando por completo las barreras naturales que separan las especies.

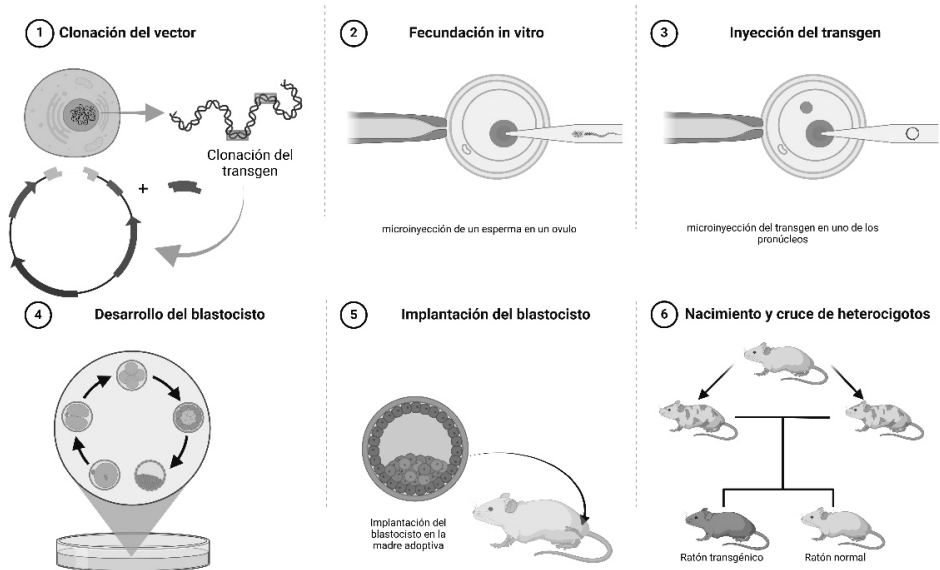
Existen dos tipos de organismos transgénicos: los transgénicos propiamente dichos, también llamados *knock in*, los cuales cuentan con un gen adicional no propio en su genoma y, por lo tanto, en todas sus células; y los organismos *knock out*, que carecen de un gen funcional en su genoma y, por lo tanto, en todas sus células, y no producen la proteína codificada por ese gen.

Generación de animales transgénicos (*knock in*)

Para la producción de un animal transgénico es necesario tener clonado en un vector el gen que se desea incorporar. A este gen se la llama transgen. El vector debe de tener un promotor que controle la expresión del transgen y dependiendo

del promotor utilizado podemos hacer que se exprese el gen en todos los tejidos o que solo se exprese en algunos en particular. En ocasiones el transgen va acompañado de un gen reportero que al expresarse desarrolla un color o fluorescencia y nos indica de manera sencilla el éxito de la incorporación del transgen a las células (transfección). Por otro lado, se obtienen óvulos de una hembra los cuales son fecundados *in vitro*. Inmediatamente después de la fecundación el óvulo es inyectado en uno de los pronúcleos con el vector conteniendo el transgen que se desea incorporar. El transgen se incorpora en el genoma del ovocito. El óvulo se replica hasta llegar al estadio de blastocisto, tiempo en el que es implantado en una hembra no preñada que previamente ha recibido tratamiento hormonal que la prepara para la anidación del blastocisto. El desarrollo embrionario sucede de manera normal hasta llegar a término. Las crías recién nacidas son sometidas a análisis molecular para la detección del transgen en su genoma. Las crías positivas serán individuos heterocigotos, los cuales tendrán que cruzarse entre hermanos para obtener organismos homocigotos que deberán ser confirmados nuevamente por análisis molecular (véase figura 1).

FIGURA 1. PROCEDIMIENTO PARA LA GENERACIÓN DE ORGANISMOS TRANSGÉNICOS

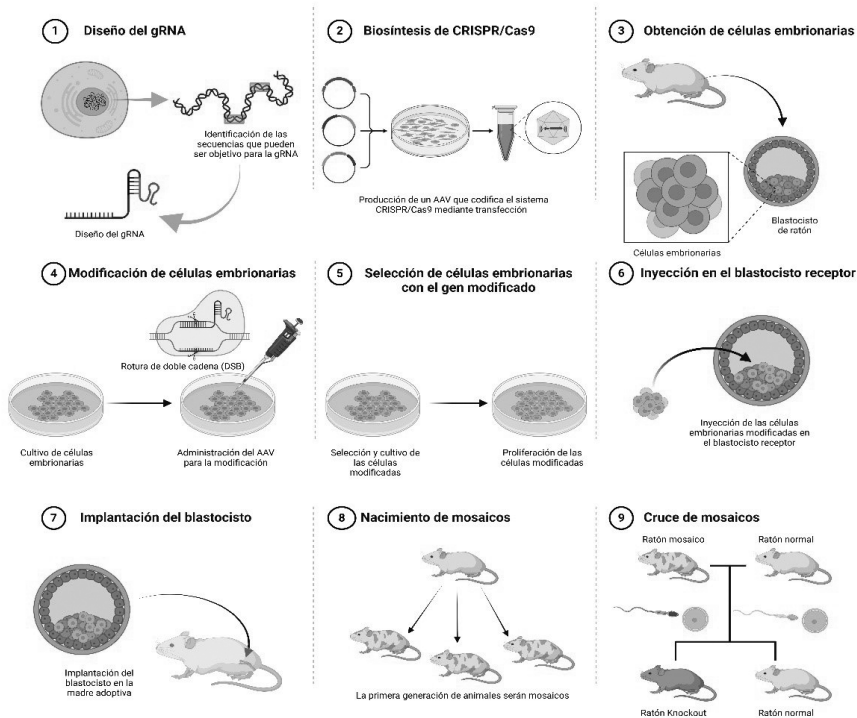


El transgen deseado se incorpora en un vector mediante el cual se introduce en un ovocito recién fecundado que, una vez en etapa de blastocisto, se implanta en una madre sustituta donde se desarrollarán los animales transgénicos.

Generación de animales *knock out*

La generación de animales *knock out* se basa en la destrucción o modificación de la secuencia de un gen. Existen varias técnicas para realizar esto, sin embargo, hoy en día el uso de la tecnología de CRISPR/CAS es la más utilizada pues ha sido adaptada para la edición precisa de genes en varios organismos (revisar capítulo 16 de esta obra). En esta tecnología se utiliza un vector de expresión que contiene el gen de una endonucleasa llamada Cas9 y un cDNA que codifica para una molécula de RNA llamada gRNA (RNA guía) que reconoce el gen que queremos modificar. El vector se transfecta en las células germinales donde se va a expresar. El gRNA se une por complementariedad de bases en su secuencia blanco y la Cas9 introduce un corte en la doble cadena de DNA donde se unió el gRNA. Ante la ruptura del DNA, las células activan el mecanismo de reparación “por recombinación no homóloga” que repara este tipo de daños. Este mecanismo frecuentemente introduce inserciones o deleciones en el sitio de corte, generando una mutación que modifica e inactiva al gen. Antes de la implantación en una madre sustituta, se confirma la presencia de la mutación en las células embrionarias a través de un análisis molecular. Una vez confirmada, el embrión se implanta en una madre sustituta y se permite el desarrollo embrionario. Al nacimiento de las crías, nuevamente se confirma la presencia de la mutación. Estas crías resultan ser heterocigotas, por lo que para establecer una línea homocigota es necesario realizar una cruce entre hermanos (véase figura 2).

FIGURA 2. GENERACIÓN DE ANIMALES *KNOCK OUT*



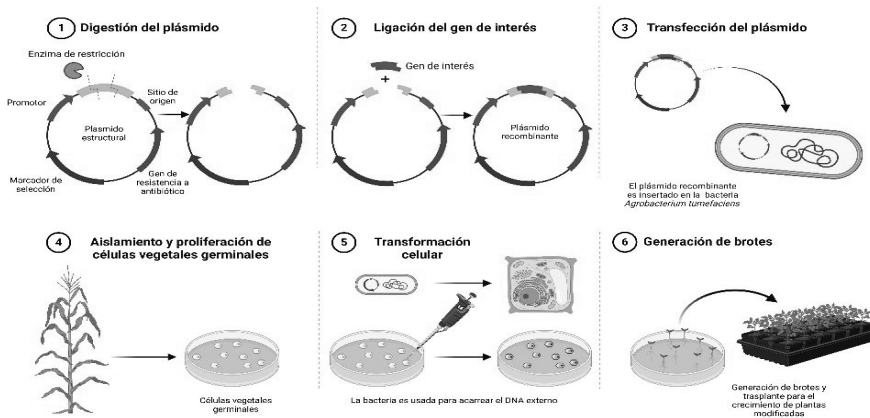
Un gRNA específico para el gen que se desea alterar es diseñado y se incorpora en un vector que contiene la maquinaria de Crip/Cas. Se introduce en células embrionarias que, una vez modificadas, se incorporan en un blastocisto que se implanta en una madre sustituta. Las crías obtenidas serán heterocigotos que se cruzarán entre sí para la obtención de homocigotos.

Generación de plantas transgénicas

Para la producción de plantas transgénicas, el transgen es clonado en un vector y entonces transfectado a una bacteria o a un virus. La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* es el vector más utilizado, ya que es un parásito natural de plantas que al colonizarlas les transfiere sus genes. El *Agrobacterium tumefaciens* transportando el transgen deseado es introducido en células germinales vegetales a través de las técnicas de biolística o microinyección. Aunque recientemente se ha logrado incorporar DNA desnudo a células vegetales mediante biolística. El transgen se integrará en el genoma de las células germinales dando lugar a plantas transgénicas.

Las especies vegetales más utilizadas para la generación de plantas transgénicas son la *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana bethamiana* y *Arabidopsis thaliana*, aunque también se han utilizado plantas de tomates, plátano, papa, arroz, trigo, maíz, habas, nabos, etc. (véase figura 3).

FIGURA 3. PRODUCCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS



El transgen es clonado en un vector, el cual es transfectado en *Agrobacterium*. El *Agrobacterium* modificado es transfectado en células germinales vegetales que darán lugar a una planta transgénica.

Historia

En 1981 Ralph Brinster, de la Universidad de Pennsylvania, y Richard Palmiter, de la Universidad de Washington, produjeron los primeros animales transgénicos. Se trataba de ratones balb/c a los que se les incorporó el gen de la hormona de crecimiento de la rata controlada por el promotor de la metalotioneina. La expresión de metalotioneina se induce en presencia de cadmio, zinc o glucocorticoides, por lo que la administración de cualquiera de estos elementos al ratón inducía la expresión de la hormona de crecimiento y el ratón crecía alcanzando tamaños hasta dos veces más grandes que los ratones silvestres.

La generación de animales transgénicos se enfocó inicialmente con fines de investigación en especies animales de laboratorio, como roedores, nematodos, mosca de la fruta, etc. Posteriormente, se generaron animales transgénicos con

finés comerciales de consumo humano en algunos animales de granja, como vacas, ovejas, conejos, gallinas, así como peces como tilapia, trucha y carpa. Hoy en día se ha extendido con otros propósitos comerciales, como gusanos de seda productores de fibras de seda de diferentes colores, orugas que contienen el gen de la espidroína, una proteína ultrarresistente producida por las arañas para tejer sus telarañas. Esta proteína se usa hoy en día como materia prima en la producción de paracaídas y chalecos antibalas. Particularmente, la generación de organismos transgénicos tiene innumerables aplicaciones en el área médica. Aquí presentamos algunas de ellas.

Animales transgénicos de uso médico

Oveja productora de la hormona de crecimiento

En 2002, científicos argentinos crearon la primera oveja transgénica llamada Pampa Mansa, cuya leche contiene la hormona de crecimiento humano. Pampa Mansa es el resultado de la fusión por electroporación de un óvulo sin núcleo con un núcleo modificado de una célula de oveja. El gen de la beta-caseína, una proteína que se expresa en tejido mamario y se encuentra en la leche fue reemplazado por el gen de la hormona de crecimiento humana (hGH, por sus siglas en inglés, *human growth hormone*), también llamada somatotropina. Con esta estrategia la hormona de crecimiento humana solo se expresa en tejido mamario y la podemos recuperar de la leche. El consumo de esta leche ha sido probado y es seguro. Ya se consume en Estados Unidos y otros países, pero existe cierta resistencia para su consumo en Europa. En ese sentido, la compañía argentina Biosidus creó una vaca productora de insulina humana que también se expresa en tejido mamario y se recupera de la leche. Los investigadores de esta compañía aseguran que, si tuvieran 25 vacas como estas, obtendrían la insulina suficiente para tratar a todos los pacientes con diabetes de su país que la requieran.

En el mismo contexto, investigadores del Instituto AgResearch de Nueva Zelanda generaron a Daisy, una vaca transgénica que produce leche hipoalérgica, ya que mencionan que entre 2% y 3% de los niños son alérgicos a alguna de las proteínas de la leche. A través de moléculas de miRNA, los investigadores inhibieron la expresión de la beta-lactoglobulina, la principal proteína alérgica de la leche.

Ternerías transgénicas productoras de inmunoglobulinas humanas

En Estados Unidos, la compañía Hematech en colaboración con algunas universidades crearon unas cabras productoras de anticuerpos humanos. Estos investigadores incorporaron en las células de las cabras un cromosoma completo que contiene todos los genes que codifican para las inmunoglobulinas humanas, un componente fundamental del sistema inmune. Los animales generados son al mismo tiempo animales transgénicos y transcromosomales, ya que contienen genes extras, pero además un cromosoma extra completo (entre el 78% y el 100% de sus células contienen el nuevo cromosoma).

Estas cabras son laboratorios vivientes productores de anticuerpos. Sin embargo, el principal reto al que se enfrentan es el purificar los anticuerpos humanos de los anticuerpos de la cabra, además de asegurarse que estén libres de virus. Su objetivo es producir cabras productoras de enfermedades importantes, como viruela, botulismo, antrax, mordeduras de serpientes, entre otras.

Animales donadores de órganos para trasplante humano

En los últimos años, tras la enorme demanda de órganos para trasplante, los médicos se han visto rebasados para cubrir esta demanda, sobre todo en los trasplantes de riñón, corazón, pulmón e hígado. Por lo que existe una enorme lista de espera con muy pocos donadores. En ese sentido, los investigadores han realizado enormes esfuerzos para cubrir esas demandas y se han enfocado en producir lechones donadores de órganos a pedido, de acuerdo a las características de los pacientes, y así tratar de cubrir las demandas y salvar más vidas humanas.

Lechones *knock out* para trasplante de órganos a humanos

El Instituto Roslin en Escocia ha creado unos lechones llamados Noel, Angel, Star, Joy, y Mary. Estos lechones tienen inactivado el gen de la enzima galactosil transferasa alfa 1,3, cuya función es añadir galactosa en la superficie de las células porcinas dándoles una especie de identidad, por lo que al ser trasplantados en otro animal son reconocidas como extrañas y son rechazadas. Sin embargo, los órganos de estos lechones *knock out* no son rechazados cuando se trasplantan en

humanos, ya que sus células no presentan galactosa en su membrana y no serán reconocidas como extrañas por el sistema inmune y serán funcionales. Otra estrategia utilizada es la incorporación de las moléculas humanas CD47, CD46, CD55 y CD59 en las células de los órganos del lechón para engañar al sistema inmune y las consideren como propios y no extraños. Estas dos estrategias han sido combinadas logrando que los órganos permanezcan por más tiempo en el receptor. Es importante mencionar que estas estrategias hasta el momento han sido probadas solo en primates y aún no han sido probadas en humanos.

Por otro lado, el trasplante de válvulas de corazón porcinas a humanos con problemas de válvulas es una práctica clínica realizada desde hace más de veinte años. Pocas son las complicaciones reportadas en los pacientes entre las que incluyen trombo-embolismo, endocarditis y rechazo. A pesar de eso, la probabilidad de éxito de las válvulas es del 96% con una vida media de cinco años. Otra estrategia utilizada en el trasplante de válvulas cardíacas consiste en recubrir las válvulas antes del trasplante con un polímero natural con la finalidad de enmascarar los xeno-antígenos y evitar el rechazo.

En 2022 una compañía estadounidense trasplantó un corazón de cerdo a un hombre de 57 años de edad de nombre David Bennett, convirtiéndose en el primer hombre en recibir un corazón de un cerdo. Bennett sufría de una fatal enfermedad de corazón. Sobrevivió dos meses al trasplante. Lentamente su sistema inmune destruyó el corazón trasplantado y su salud se deterioró hasta alcanzar la muerte.

Cerdos con omega-3

En la escuela de medicina de la Universidad de Pittsburg en Estados Unidos, un grupo de investigadores dirigidos por el doctor Yifan Dai crearon cerdos transgénicos productores de omega-3, un ácido graso insaturado muy benéfico para la salud y que se encuentra de manera natural en peces, como atún y salmón. Para realizarlo, los investigadores incorporaron en las células germinales del pez el gen *fat-1* que codifica para una enzima desaturasa, cuya función es transformar el omega-6 en omega-3. Las células germinales fueron transplantadas en el útero de madres sustitutas para permitir el desarrollo embrionario. Dada la cercanía fisiológica entre el hombre y el cerdo, estos cerdos han ayudado a estudiar el efecto del omega-3 en enfermedades cardiovasculares en humanos.

Gallinas productoras de proteínas terapéuticas

Desde la producción de la insulina recombinante en bacterias en los ochenta, el objetivo de muchas empresas farmacéuticas ha sido producir proteínas recombinantes para el tratamiento de varias enfermedades, y para esto se han enfocado en producir animales transgénicos que produzcan estas proteínas recombinantes. En ese sentido, científicos del Instituto Roslin han producido gallinas transgénicas conteniendo genes que codifican para algunas proteínas usadas en el tratamiento de cáncer y otras patologías. Estas proteínas se extraen del huevo para preparar los medicamentos correspondientes. Entre estas proteínas están el interferón, la eritropoyetina y anticuerpos para el tratamiento de cáncer y artritis. Cada gallina transgénica puede producir hasta 250 huevos por año y cada huevo contiene alrededor de 100 mg de proteína terapéutica.

Gallina productora de lipasa ácida liposómica

La deficiencia de la enzima liposomal lipasa ácida (LIPA) es una enfermedad metabólica relacionada con el almacenamiento de grasa: la forma más severa de la enfermedad se conoce como la enfermedad de Wolman y puede provocar la muerte antes del primer año de edad. En versiones menos severas causa la acumulación de lípidos en el hígado, bazo, sistema circulatorio provocando agrandamiento del hígado, fibrosis, cirrosis y enfermedades cardiovasculares.

Desde 2015, se encuentra disponible comercialmente en Europa y Estados Unidos un medicamento llamado sebelipasa alfa kanuma, similar a la lipasa ácida lisosomal humana. Esta proteína es obtenida de los huevos de gallinas transgénicas y se usa como tratamiento en pacientes con deficiencia genética de lipasa ácida lisosomal y en problemas de dislipidemia y disfunción hepática.

Cabra productora de antitrombina humana

Atryn es una droga recombinante aprobada en Europa en 2006 y por la FDA en Estados Unidos en 2009. Atryn contiene antitrombina recombinante humana obtenida de la leche de una cabra transgénica. Con la leche se prepara

un polvo blanco que se aplica a los pacientes a través de una infusión intravenosa con la intención de prevenir trombosis venosa profunda y otro tipo de tromboembolismos.

Organismos transgénicos como modelos de enfermedad

La producción de animales transgénicos también ha sido utilizada para la generación de modelos de enfermedades humanas. Para realizarlo, se transfiere en las células germinales de animales experimentales el gen responsable de la enfermedad. Estos modelos son utilizados para estudiar la enfermedad desde su inicio, así como la progresión y el uso de nuevos tratamientos. Los animales más utilizados para generar estos modelos son el ratón, la rata, el simio y el cerdo. Entre las enfermedades más estudiadas están la osteoporosis, enfermedades infecciosas, diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, enfermedades neurodegenerativas y diversos tipos de cáncer. Para el estudio de enfermedades como osteoporosis y enfermedades inflamatorias se usan preferentemente simios, y para enfermedades cardiovasculares e hipertensión se usan cerdos.

Plantas transgénicas con aplicaciones médicas

Las plantas transgénicas han sido utilizadas para la producción de anticuerpos desde hace más de 20 años. Dado su origen, estos anticuerpos son llamados planticuerpos. Las especies vegetales más utilizadas para este fin son el tabaco, la papa, la soya, la alfalfa y el arroz y son generados para combatir principalmente diferentes tipos de cáncer e infecciones virales, como hepatitis, rabia, y citomegalovirus. Los planticuerpos se producen en toneladas dado que son obtenidos mayormente de las hojas, las cuales pueden ser cosechadas varias veces al año y son estables tanto a temperatura ambiente como a 4 °C. Algunos de los planticuerpos más famosos son: la quimera IgG/IgA contra el antígeno de superficie de *Streptococcus mutans*, el principal agente causante de la caries dental; este anticuerpo se produce en la planta del tabaco y es aplicado tópicamente en las encías y los dientes para prevenir la recolonización del *Streptococcus*. El

anticuerpo IgG1 contra el antígeno carcinógeno utilizado para el tratamiento de pacientes de cáncer de colon y de seno es obtenido de plantas transgénicas de tabaco, arroz y *arabidopsis*, así como el anticuerpo monoclonal contra CD30 humano que se usa en el tratamiento de linfoma de Hodgkin.

Las plantas transgénicas también han sido generadas para la producción de vacunas. Presentan las ventajas de que son comestibles y seguras, no se genera basura peligrosa e infecto-contagiosa, ya que no se usan agujas ni jeringas, son baratas y fáciles de administrar, por lo que resultan ideales para países subdesarrollados que no cuentan con infraestructura para el almacenamiento de las vacunas convencionales que debe de ser a bajas temperaturas.

Varias de las vacunas humanas se producen utilizando esta tecnología, y entre ellas tenemos a la vacuna contra *E coli* enterotóxica, contra *Vibrio cholera*, virus de hepatitis B, virus de Norwalk, virus de la rabia y cytomegalovirus, entre otros. Específicamente, una vacuna contra el virus de la hepatitis B ha sido producida en la planta de la papa expresando el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HsBAg). Para su evaluación se utilizaron 42 voluntarios sanos previamente vacunados contra hepatitis B a los que se les dio a ingerir papa transgénica cruda en tres ocasiones. Alrededor del 60% incrementaron sus títulos de anticuerpos circulantes contra HsBAG, indicando teóricamente que adquirieron protección contra la infección del virus.

Otras proteínas recombinantes generadas en plantas

Muchas de las proteínas circulantes en la sangre desempeñan funciones variadas vitales para la vida. Algunas son enzimas involucradas en el metabolismo celular, otras participan en la respuesta inmune, otras funcionan como hormonas, transportadores de lípidos, vitaminas o minerales, entre muchas otras funciones. En este contexto, proteínas humanas como albumina, aprotinina, encefalina, hemoglobina, α_1 antitripsina, proteasa C, glucocerebrosidasa, acetylcolinesterasa, transglutaminasa, colágena, lactoferrina, factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF)(53), (54), interferón alfa (55), interferón beta (56), interferón-gama (57), hormona de crecimiento humano (58), eritropoietina, factor de crecimiento de endotelio vascular, interleucina-2, interleucina-6 (59), interleucina-10 e interleucina-12, entre otras,

son producidas de manera recombinante en plantas para el tratamiento de diversas enfermedades. Sin lugar a dudas, la insulina humana es la proteína humana recombinante más importante. En 2009 la compañía biotecnológica canadiense SemBioSys Genetics desarrolló una planta de cártamo transgénica que produce la insulina recombinante humana para el tratamiento de la diabetes. Esta insulina es estructural y funcionalmente equivalente a la insulina humana, reduciendo su costo de producción en más del 40%.

Actualmente, las semillas de ciertos cereales, como maíz, arroz, cebada y trigo, son consideradas buenos recipientes para el almacenamiento de proteínas recombinantes. Las proteínas pueden estar en la semilla por largo tiempo y en ausencia de compuestos fenólicos se mantienen estables. La proteína se puede suministrar de manera oral, pero si se requiere extraerla, los métodos de extracción son rápidos y sencillos.

Conclusiones

A pesar de los enormes avances realizados en el área de la biomedicina, la generación de organismos transgénicos es, sin lugar a dudas, uno de los más importantes. Desde la creación del primer animal transgénico en 1980, la producción de biomoléculas en estos organismos ha mejorado enormemente y ha impactado favorablemente a la salud, ya que los productos obtenidos de ellos se utilizan tanto en procesos de inmunización como de diagnóstico y tratamiento de muchas enfermedades humanas. A la par de estos beneficios, los costos de producción han disminuido debido a que la producción es a gran escala. Particularmente con las plantas transgénicas, la posibilidad del almacenamiento de la proteína recombinante en las semillas, las hojas o los tallos ahorra la necesidad de infraestructura que mantenga los productos a bajas temperaturas, lo que reduce el costo de producción y facilita la distribución a diferentes partes del mundo, especialmente en países subdesarrollados que no cuentan con este tipo de infraestructura. Aunado a esto, la generación de vacunas en plantas evita el uso de agujas y jeringas, puesto que para estar inmunizados bastará con el consumo de alguna parte de la planta. Esta medida además de disminuir los costos, evita la generación de basura infecto-contagiosa.

Hasta el momento no existen evidencias de que el consumo de organismos transgénicos resulte perjudicial para la salud, sin embargo, el riesgo más importante de su uso es a nivel ecológico, ya que se están generando “superespecies” que no cuentan con un depredador natural, por lo que el número de individuos transgénicos crece sin control con lo que se alteran las cadenas alimenticias y los ecosistemas, ocasionando una pérdida en el balance ambiental dado que es prácticamente imposible eliminar genes que fueron introducidos en la naturaleza de manera artificial.

Referencias

- Chen, R. H., Naficy, S., Logan, J. S., Diamond, L. E. y Adams, D. H. (1999). Hearts from transgenic pigs constructed with CD59/DAF genomic clones demonstrate improved survival in primates. *Xenotransplantation*, 6, 194-200. <https://doi.org/10.1034/j1399-3089.1999.00017.x>
- Czerniawska-Piątkowska, E., Brosędzki, L., Cioch, B. y Rzewucka-Wo, E. (2016). The usage of transgenic animals in therapeutic proteins production. *Folia Pomor Univ Technol Stetin Agric Aliment Pisc Zootech*, 330(40), 73-80. Doi: 10.21005/AAPZ2016.40.4.08.
- Diamond, L. E., McCurry, K. R., Martin, M. J., McClellan, S. B., Oldham, E. R., Platt, J. L. y Logan, J. S. (1996). Characterization of transgenic pigs expressing functionally active human CD59 on cardiac endothelium. *Transplantation*, 61(8), 1241-1249. <https://doi.org/10.1097/00007890-199604270>
- Fantozzi, A. y Christofori, G. (2006). Mouse models of breast cancer metastasis. *In Breast Cancer Research*, 8(4). <https://doi.org/10.1186/bcr1530>
- Griffith, B. P., Goerlich, C. E., Singh, A. K., Rothblatt, M., Lau, C. L., Shah, A., Lorber, M., Grazioli, A., Saharia, K. K., Hong, S. N., Joseph, S. M., Ayares, D. y Mohiuddin, M. M. (2022). Genetically Modified Porcine-to-Human Cardiac Xenotransplantation. *New England Journal of Medicine*, 387(1), 35-44. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2201422>
- Guy, C. T. y Cardoso, G. (2001). Transgenic Animal Models. *Methods in Molecular Medicine*, 58, 231-249. <https://doi.org/10.1385/1-59259-137-X:231>

- He, Z., Lu, R., Zhang, T., Jiang, L., Zhou, M., Wu, D. y Cheng, Y. (2018). A novel recombinant human plasminogen activator: Efficient expression and hereditary stability in transgenic goats and in vitro thrombolytic bioactivity in the milk of transgenic goats. *PLoS ONE*, 13(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201788>
- Loveland, B., Milland, J., Kyriakou, P., Thorley, B., Chiristiansen, D., Lanteri, M., Regensburg, M., Duffield, M., French, A., Williams, L., Baker, L., Bradon, M., Xing, P., Kahn, D. y McKenzie, I. (2004). Characterization of a CD46 transgenic pig and protection of transgenic kidneys against hyperacute rejection in non immunosuppressed baboons. *Xenotransplantation*, 11(2), 171-183. https://doi.org/10.1046/j.1399-3089.2003.00103_11_2.x
- Martínez-Alarcón, L., Liarte, S., Quereda, J. J., Sáez-Acosta, A., De Torre-Mingueta, C., Mendonça, L., Abellaneda, J. M., Majado, M. J., Ríos, A., Ramírez, P., Muñoz, A. y Ramis, G. (2021). Profiling human CD55 transgene performance assist in selecting best suited specimens and tissues for swine organ xenotransplantation. *Biology*, 10(747). <https://doi.org/10.3390/biology10080747>
- Obembe, O., Popoola, J., Leelavathi, S. Reddy, S. (2011). Advances in plant molecular farming. *Biotechnology Advances*, 29(2), 210-222. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.004>
- Sheridan, C. (2016). FDA approves farmaceutical drugs from transgenic chickens. *Nature Biotechnology*, 34(2), 117-9. <https://doi.org/10.1038/nbto216-117>

Aplicaciones de RNA de interferencia en la medicina

Adriana María Salazar Montes

Eva Solis Sta

Jesús Fernando Guerrero Rodríguez

Introducción

La interferencia de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) es un mecanismo de defensa natural de las células eucariotas contra la invasión de genes exógenos; dicho mecanismo es muy conservado entre las diferentes especies de seres vivos y su función principal es inhibir la expresión de genes a nivel postranscripcional. La inhibición se lleva a cabo a través de una molécula de ARN de interferencia pequeño (siRNA, por sus siglas en inglés, *small interference RNA*), la cual se une por complementariedad de bases a un ARN mensajero específico, bloqueando así la expresión de ese gen.

El descubrimiento de estas moléculas de ARN de interferencia como un mecanismo de inhibición de la expresión de genes, ha puesto en evidencia una nueva forma de regulación génica. Una de las principales ventajas de su uso es que la inhibición de la expresión génica es a nivel postranscripcional y es transitoria. El entendimiento de este proceso ha permitido que hoy en día se diseñen de manera sintética moléculas de siRNA dirigidas a bloquear la expresión de genes de manera selectiva.

Los siRNA provienen de un gen ancestral común conservado entre las especies. En eucariotas superiores este mecanismo ha evolucionado para controlar la expresión de genes endógenos. Se cree que al menos el 30% de los genes humanos son regulados por este mecanismo. Los siRNA fueron descubiertos

por primera vez en petunias en los años ochenta. Al introducir un ARNm con la finalidad de generar un color más intenso en la flor, se observó un resultado contrario, las flores adquirirían un color más tenue.

En 1998 Fire y Melow usaron esta estrategia en un modelo de gusano de seda, demostrando que al utilizar un siRNA con secuencia complementaria a un ARNm específico, se inhibía la expresión del gen correspondiente. Este descubrimiento los hizo merecedores de ser los ganadores del premio Nobel de medicina en 2006 “por descubrir un novedoso mecanismo del control de la expresión génica” (Fire *et al.*, 1998). Este descubrimiento puso en evidencia una novedosa forma de regulación génica que se podía utilizar como una herramienta biotecnológica.

Los siRNA son pequeños ARNs de doble cadena que se unen por complementariedad de bases a una región específica de un ARNm. Si la complementariedad de bases es completa, se induce la degradación del ARNm, y si es incompleta, se bloquea la traducción. Por cualquiera de estos dos mecanismos se inhibe la expresión del gen de manera transitoria a nivel postranscripcional. Como mencionamos anteriormente, las moléculas de siRNA se pueden producir endógenamente por las células, o se pueden diseñar para que sean complementarios aun ARNm de interés para posteriormente fabricarlos por síntesis química y utilizarlos en modelos celulares, animales y/o vegetales.

Tipos de ARNs de interferencia

Los ARNs de interferencia son ARNs no codificantes (lncRNAs, por sus siglas en inglés, *long non coding RNAs*) que participan en la regulación de la expresión génica tanto en el proceso de transcripción, en modificaciones postranscripcionales, así como en la interrupción de la traducción. Se clasifican de acuerdo a su tamaño, estructura y función en ARNs largos no codificantes (lncRNA) de aproximadamente 200 nucleótidos y ARNs pequeños no codificantes (sncRNA, por sus siglas en inglés, *small noncoding RNAs*) menores de 200 nucleótidos.

lncRNA

Aunque la mayoría de lncRNAs son no codificantes, recientemente se han encontrado algunos lncRNAs que codifican para pequeñas proteínas o micropéptidos. Algunos lncRNAs incluyen regiones intergénicas, intragénicas, sentido o antisentido. Los principales mecanismos de acción de los lncRNAs son en la regulación transcripcional y la regulación epigenética al unirse a ciertas regiones del promotor, interrumpiendo la transcripción.

sncRNA

En relación con los sncRNA, se han descrito tres distintas moléculas de interferencia: micro ARN (miRNA, por sus siglas en inglés, *micro ribonucleic acid*), ARN de interferencia pequeño (siRNA, *small interference ribonucleic acid*), y ARN asociado a PIWI (piRNA, *piwi-interacting RNA*). PIWI (*P-element Induced WImpy testis in Drosophil*) es una proteína que se une a ciertas regiones del ADN donde existen transposones y su mecanismo de acción es, junto con un siRNA impedir la movilidad de estos transposones a lo largo del genoma. Este mecanismo solo se ha observado en animales y es necesario realizar más estudios para dilucidar a más detalle su función biológica.

miRNA

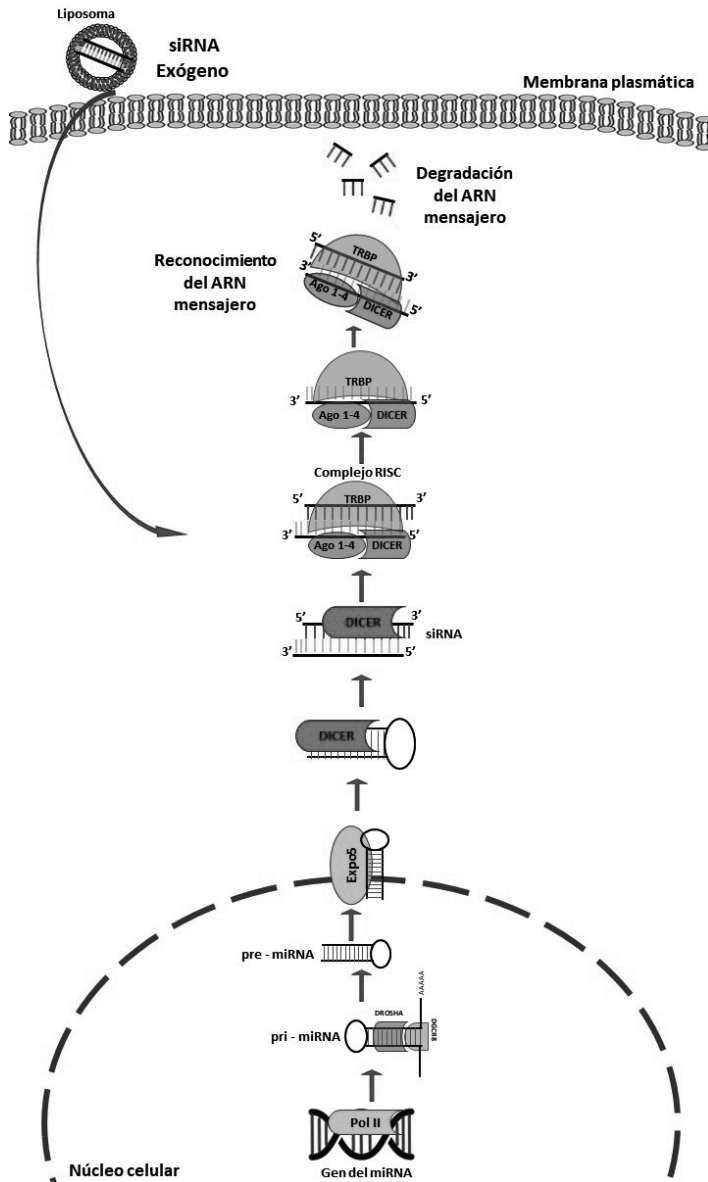
Los miRNA son moléculas cortas de ARN doble cadena (ARNdc) de entre 21 y 25 nucleótidos de longitud y su secuencia está codificada en el genoma. Se generan por la acción de la RNA polimerasa II como un precursor primario llamado pri-miRNA con estructura de horquilla y dos colas no apareadas. El pri-miRNA es procesado por una RNAasa III denominada Drosha presente en el núcleo, produciendo una molécula más pequeña en forma de horquilla denominada pre-miRNA de una longitud aproximada de 65-70 nucleótidos. La horquilla de pre-miRNA es exportada al citoplasma por la exportina 5, donde una RNAasa llamada DICER la corta de manera escalonada en pequeños fragmentos de RNA de doble cadena de 21 a 25 nucleótidos de longitud, cuyo extremo 3' presenta dos nucleótidos no apareados; esta molécula es conocida como

RNA de interferencia pequeño (siRNA). Los siRNAs inducen en el citoplasma la formación de un complejo de proteínas denominado RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) al cual se le une. El complejo RISC contiene una helicasa que separa las dos cadenas del siRNA y se queda unido a una de ellas. RISC puede quedarse con la cadena sentido (cadena pasajera) o la antisentido (cadena guía) del siRNA. El mecanismo por el cual RISC determina con cuál cadena quedarse es complejo, pero se cree que la helicasa del RISC se queda con la cadena de RNA cuyo extremo 5' sea más fácil de abrir. Una vez que RISC se queda con una de las cadenas, busca el RNA complementario a su secuencia y se une a él. Si la molécula de siRNA es perfectamente complementaria al RNAm, una nucleasa del complejo RISC homóloga a DICER denominada DICER2 lo corta en dos partes, las cuales son degradadas por la maquinaria celular. Si solo es parcialmente complementario, se queda unido al RNAm bloqueando la traducción de este. Con cualquier de estos dos mecanismos la expresión del gen es bloqueada a nivel postranscripcional (véase figura 1). Hasta el momento se han sido identificados alrededor de 35 000 miRNA diferentes en 223 especies de plantas y animales.

siRNA

Las moléculas de siRNA de origen endógeno son pequeños RNAs de doble cadena obtenidos a través del procesamiento de los miRNA. Además, se pueden diseñar siRNAs con el objetivo de silenciar o inhibir la expresión de un gen de interés, los cuales pueden ser producidos mediante síntesis química y utilizados en diferentes modelos como cultivos celulares utilizando diferentes tipos de vectores. También se pueden producir siRNA diseñados de forma endógena mediante el uso de vectores como plásmidos que contengan la secuencia genética que codifique para una molécula similar al pre-miRNA, llamada shRNA (*short hairpin RNA*), que se procesa por el mismo mecanismo que los endógenos naturales, generando las moléculas de siRNA de una longitud de 21-25 nucleótidos (véase figura 2). Independientemente de su origen, una vez presente en el citoplasma, los siRNA inducen la formación del complejo RISC, el cual orquestará la degradación del RNAm al cual es complementario, inhibiendo la expresión del gen a nivel postranscripcional como previamente se explicó (véase figura 1).

FIGURA 1. MECANISMO DE SILENCIAMIENTO GENERAL POR MIRNAS

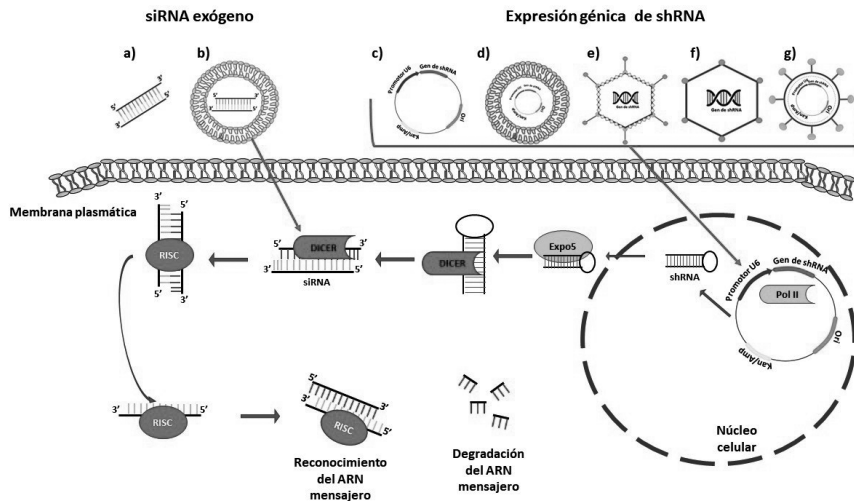


El gen de miRNA es transcrito a pri-miRNA por la RNA polimerasa II, el cual es procesado por la ribonucleasa DROSHA a pre-miRNA. El pre-miRNA es transportado al citoplasma por la exportina 5 donde DICER lo procesa en RNA pequeño de doble cadena llamado siRNA. DICER induce la formación de un complejo multiproteico llamado RISC, el cual se une al siRNA eliminando una de sus cadenas y conservando la complementaria al RNAm. Este complejo se une al RNAm por complementariedad de bases induciendo su degradación.

Vectores para la transferencia de siRNA

Los vectores más utilizados para la transferencia de shRNAs en modelos celulares o animales son plásmidos, adenovirus, lentivirus, retrovirus y adenoasociados. Estos vectores permiten la transferencia de estas moléculas hasta el núcleo, en donde la secuencia del shRNA será transcrita por la polimerasa III y se producirán moléculas de siRNA. Esta estrategia permite la expresión temporal del shRNA y, por lo tanto, de las moléculas de siRNA, por lo que observamos la inhibición de la expresión génica por más tiempo (véase figura 2).

FIGURA 2. VECTORES USADOS PARA EL ENVÍO DE SIRMAS A LAS CÉLULAS



Existen dos mecanismos para el uso de siRNAs como estrategia biotecnológica. Una es sintetizando moléculas de siRNA que se introducen a las células donde serán reconocidas por DICER e inducirán la degradación del RNAm blanco. La otra es a través del uso de un vector que entra al núcleo e induce la expresión de un shRNA que será procesado a siRNA.

Para la transferencia de siRNAs sintéticos se utilizan dos estrategias, administración directa del siRNA y por lipofección. Utilizando estas moléculas de micro-ARNs, el efecto de la inhibición de la expresión génica es mucho más rápido, debido a que su mecanismo de silenciamiento inicia en el citoplasma de la célula, sin embargo, tienen la desventaja de que se necesita la administración de dosis continuas para obtener un efecto más prolongado.

Aplicaciones de la tecnología de los ARNs de interferencia

El entendimiento del mecanismo por el cual los siRNA controlan la expresión génica, nos ha permitido el desarrollo de estrategias que nos permitan controlar la expresión de distintos genes de interés. Actualmente, estas estrategias se utilizan en distintas áreas, ya sea con fines de investigación y/o aplicada, como en la agricultura y ciencias de la salud.

Su uso en diferentes organismos nos ha permitido obtener información sobre los genes involucrados en el desarrollo, la reproducción, el comportamiento y el sistema inmune, entre otros mecanismos.

Por ejemplo, las moléculas de siRNA se pueden utilizar en aquellos casos donde la sobreexpresión de un gen está relacionada con alguna patología. En estos casos el envío de un siRNA dirigidos al ARNm sobreexpresado disminuye la síntesis de la proteína involucrada en el daño. Este importante recalcar que este mecanismo es transitorio y provoca pocos o nulos efectos adversos.

siRNA en insectos

La tecnología de ARNs de interferencia podría ser utilizada para evitar la propagación de enfermedades transmitidas por insectos, ya sea interfiriendo en mecanismos que ayuden a evitar la sobrepoblación o directamente sobre moléculas que ayudan a la transmisión.

La enfermedad de Chagas es una enfermedad infecciosa causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (TC), el cual es transmitido por la picadura del insecto hematófago *Rhodnius prolixus*. En el año 2006, un grupo de investigadores diseñaron una molécula de siRNA complementaria al ARNm de la proteína anticoagulante nitroporina 2, la cual es utilizada por este insecto para evitar la coagulación de la sangre. Mediante lipofección administraron oralmente en larvas el siRNA, esto resultó en una disminución significativa en la expresión de la nitroporina 2, en donde administraron vía oral una formulación de liposomas con moléculas de siRNAs, lograron introducir un siRNA en liposomas y administrados por vía oral en las larvas de *Rhodnius prolixus*, una chinche que

transmite la enfermedad de Chagas. La molécula de siRNA fue dirigida contra el transcrito de una proteína anticoagulante denominada nitroporina 2, lo que significó una disminución de la actividad anticoagulante; esta estrategia podría evitar la transmisión de TC por la picadura del insecto.

Por otro lado, en otra investigación, se diseñó una molécula de siRNA complementaria al ARNm de carboxilesterasa intestinal de la polilla *Epiphyas postvittana*. La administración oral en larvas de esta polilla redujo considerablemente la expresión de la enzima, lo que significó en la reducción del número de individuos que llegaron a la etapa adulta. Este estudio nos demuestra que este tipo de tecnología podría utilizarse para el control poblacional de los insectos que causan daños en agricultura.

Otro caso de éxito ha sido su utilización en las hembras del mosquito *Aedes aegypti*, el mosquito transmisor del dengue. La administración tópica de un siRNA contra el transcrito de la proteína AaeIAP1, una proteína inhibidora de la apoptosis incrementó significativamente la mortalidad de estos insectos con una disminución en la capacidad de eclosión de los huevecillos. El uso de la tecnología de ARNs de interferencia tiene un gran potencial para su uso en el desarrollo de insecticidas moleculares para evitar la sobrepoblación de insectos dañinos para los cultivos y vectores de enfermedades infecciosas.

Aplicación de siRNA en enfermedades humanas

Amiloidosis hereditaria

La primera enfermedad aprobada por la FDA para el tratamiento con moléculas de siRNA fue la amiloidosis hereditaria por transtiretina (ATTRh) en pacientes adultos con polineuropatía en estadio 1 y 2. Esta enfermedad es ocasionada por la mutación del gen que codifica para la proteína transtiretina (TTR), una proteína precursora del amiloide que actúa como transportador de la tiroxina y de la vitamina A. Se sintetiza principalmente en el hígado (95%) y en un pequeño porcentaje en la retina y en los plexos coroideos. Tanto en la sangre como en

el líquido cefalorraquídeo circula en forma de tetrámero. La TTR mutada hace que se desestabilice el tetrámero, dando lugar a monómeros que se pliegan anormalmente y se precipitan en los diferentes tejidos, principalmente en el sistema nervioso periférico y corazón ocasionando trastornos neurológicos. El medicamento utilizado se llama onpattro (patisirán) y se trata de nanopartículas lipídicas conteniendo un siRNA de doble cadena dirigido contra la región 3' conservada del RNAm de TTR, lo que induce su degradación en el hígado y por ende una reducción de la proteína TTR en suero. Los pacientes tratados con onpattro disminuyeron sus niveles séricos de TTR en 80% entre 10 y 14 días después de una dosis única de 300 mg/kg de peso. Al cabo de 9 y 18 meses de tratamiento la reducción observada fue de entre 83% y 84% respectivamente y se mantuvo con la administración continua.

Hipercolesterolemia

Los niveles circulantes altos de lípidos de baja densidad (LDL) son un factor de riesgo importante para hipertensión, accidentes cerebro vasculares e infartos. Para su metabolismo, los LDL son introducidos a las células a través de un receptor presente en la membrana llamado receptor de LDL. La proteína PCSK9 se une al receptor de LDL, evitando que los LDL se unan a su receptor y provoquen las altas concentraciones de LDL en la sangre. En ese sentido, la compañía farmacéutica Alnylam en 2012 desarrolló un protocolo clínico fase 1, utilizando una molécula siRNA contra el transcrito de la proteína PCSK9. Se incluyeron 32 voluntarios sanos y 24 pacientes con colesterol-LDL elevada. Se utilizó una dosis de 0.015- 0.400 mg/kg de siRNA, logrando una reducción del 70% en los niveles de proteína circulante y 40% en la reducción de colesterol. En 2018 se desarrolló el estudio fase 2 ahora en pacientes homocigotos para la hipercolesterolemia familiar, obteniendo resultados similares.

Degeneración macular

La degeneración macular es la causa más frecuente de la pérdida irreversible de la visión central en adultos mayores. Este tipo de visión es necesaria para ver claramente los objetos y permite leer y manejar sin problemas. La pérdida de

la visión central es causada por la muerte y degeneración de células epiteliales pigmentosas de la retina, las cuales están sujetas a estrés oxidativo crónico debido a las grandes cantidades de oxígeno que consumen. En ese sentido, la compañía Pfizer realizó un estudio en pacientes con degeneración macular asociada a la edad donde se probó un siRNA llamado PF-04523655, el cual inhibe de manera específica al gen RTP801, gen de respuesta a estrés inducido por hipoxia. En un estudio inicial de fase I PF-04523655 fue tolerado sin problemas. En el estudio en fase II se observó una mejoría significativa de la visión después de 12 meses de tratamiento no presentándose efectos adversos serios. Debido a estos resultados se contempló realizar el estudio de fase III utilizando dosis mayores de PF-04523655 para poder determinar la dosis más adecuada para su tratamiento.

Cáncer

Respecto al cáncer, existen diversos protocolos clínicos aprobados utilizando moléculas de siRNA en el tratamiento. En cáncer hepático específicamente, entre 2009 y 2011 se desarrolló un protocolo clínico utilizando liposomas para el envío de siRNA contra el transcrito del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y contra el de la proteína de huso mitótico KSP (*kinesin spindle protein*), los dos factores importantes en la proliferación de las células cancerosas. Cada paciente recibió un promedio de 6.8 dosis cada dos semanas, logrando disminuir la concentración del RNAm de estas dos moléculas y se observó una significativa actividad antitumoral.

En cuanto a cáncer de mama, el subtipo triple negativo (TNBC, por sus siglas en inglés, *triple negative breast cancer*) es el más difícil de tratar debido a que los pacientes con este subtipo presentan una expresión significativamente mayor del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF, por sus siglas en inglés, *vascular endothelial growth factor*) que los pacientes no TNBC. En estos pacientes, VEGF actúa como un factor de sobrevivencia para las células cancerosas, por lo que su inhibición podría ser un factor importante en el tratamiento. En ese sentido, varios estudios *in vitro* han evaluado el efecto del envío de moléculas de siRNA anti- VEGF en liposomas a células cancerosas de mama. Los resultados obtenidos demostraron una disminución significativa en la expresión de VEGF, inhibición en la migración e invasión de las células TNBC, así como inhibición en el crecimiento del tumor.

Por otra parte, P53 es el gen supresor de tumores más eficiente con que cuenta la célula. Su función es resguardar la integridad del DNA e inducir apoptosis en caso de que detecte algún daño importante en el DNA. Personas con mutación en este gen presentan predisposición a desarrollar cáncer, además de estar asociada con una pobre respuesta a las terapias. En ese sentido, se han generado cuatro diferentes moléculas de siRNA dirigidas contra las cuatro mutaciones más importantes del gen P53, las cuales representan alrededor del 20% de todas las mutaciones. Estos siRNAs llamados MupSis fueron diseñados para silenciar solo la expresión de los P53 mutantes sin afectar la expresión del P53 silvestre. Esta terapia ha demostrado retardar el crecimiento del tumor e inducir muerte celular en estudios experimentales.

En 2011, una compañía alemana de nombre Atuplex desarrolló un siRNA llamado tuRNAi para inhibir procesos de angiogénesis y un sistema de envío para su aplicación *in vivo* llamado Atuple, que ha tenido excelentes resultados.

Infecciones virales

El empleo de moléculas de siRNA ha sido particularmente útil en el combate de enfermedades causadas por virus, en especial para aquellos virus que desarrollan enfermedades crónicas mortales y que no cuentan con un esquema de tratamiento efectivo.

Virus de la hepatitis C

La infección con el virus de la hepatitis C (HCV) es una causa muy importante de enfermedades hepáticas crónicas, las cuales pueden evolucionar a cáncer hepatocelular y llevar a los pacientes a la muerte. Existen reportes de estudios usando moléculas de siRNAs enviados en diferentes vectores dirigidos a la región 5' no traducida (UTR, por sus siglas en inglés, *untranslated region*), la cual es necesaria para el proceso de traducción logrando hasta 80% en la inhibición de la replicación del virus. En el mismo sentido, siRNA dirigidos a los RNAm de las proteínas NS3, NS4B y NS5B lograron reducir la replicación viral y la infección. Otro reporte donde se utilizaron shRNAs dirigidos contra

el sitio interno del ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés, *internal ribosome entry site*) demostró una inhibición en la replicación de diferentes genotipos del virus de la hepatitis C en células en cultivo. La mayoría de los estudios utilizando moléculas de siRNA como tratamiento para la infección de HCV han demostrado ser más eficientes que el uso de IFN. En 2015 se realizó un ensayo clínico en donde a través de un vector adenoasociado se enviaron a hepatocitos de sujetos infectados con el virus de la hepatitis C, tres diferentes secuencias de shRNA contra diferentes genes del virus de la hepatitis C. En este protocolo de fase I se evaluaron seguridad, tolerancia de dosis y eficacia observando una significativa reducción en la carga viral.

Virus de VIH

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es una enfermedad crónica debilitante que no ha podido ser curada con terapias antirretrovirales, por lo que han surgido nuevas estrategias terapéuticas para su tratamiento. Entre estas terapias se encuentran las que usan moléculas de siRNA para silenciar genes virales o genes del huésped que el virus utiliza para su infección y replicación. De hecho, el SIDA fue la primera enfermedad infecciosa tratada con moléculas de siRNA, dado que tanto su ciclo de vida como su expresión génica están bien estudiadas. Se han utilizado moléculas de siRNA para prácticamente todos los genes del virus (tat, rev, gag, pol, nef, vif, env, vpr, LTR) en estudios *in vitro* y algunos estudios con pacientes. A pesar de que los resultados son tempranos estos no son muy alentadores, pues el principal reto a vencer en esta enfermedad es la alta tasa de mutación que presenta este virus.

Virus sincitial respiratorio

La compañía farmacéutica Alnylam en 2008 realizó un estudio de fase II en pacientes trasplantados de pulmón con infección del virus sincitial respiratorio (RSV) confirmada, virus que ocasiona afecciones respiratorias severas especialmente en neonatos. En este estudio, a través de nebulizaciones se aplicó diariamente por tres días a 24 pacientes una molécula de siRNA dirigido al transcrito de una proteína de la nucleocápside viral (ALN-RSV01). Los

síntomas característicos de la enfermedad fueron significativamente reducidos, en especial la bronquiolitis obliterativa. La administración de ALN-RSV01 fue segura y bien tolerada en los pacientes, por lo que se concluye que el tratamiento con ALN-RSV01 podría tener beneficioso a largo plazo para pacientes trasplantados de pulmón con infección por RSV.

TABLA. 1. PRINCIPALES PROTOCOLOS CLÍNICOS PARA DIVERSAS ENFERMEDADES QUE INVOLUCRAN EL USO DE MOLÉCULAS DE SIRNA EN SU TRATAMIENTO

ENFERMEDAD	VECTOR	RNAM BLANCO	AUTOR
Amiloidosis hereditaria	Liposomas	Región 3' conservada del RNAm de la proteína transtiretina (TTR)	Zhang <i>et al.</i> , 2020
Hipercolesterolemia	Liposomas	Binding protein to LDL receptor (PCSK9)	Fitzgerald <i>et al.</i> , 1998 NCT 02963311
Degeneración macular	Liposomas	Gen de respuesta a estrés inducido por hipoxia (RTP801)	Nguyen <i>et al.</i> , 2012. NCT00725686
Degeneración macular	Liposomas	Gen de respuesta a estrés inducido por hipoxia (RTP801)	Jiang <i>et al.</i> , 2021 NCT00701181
Cáncer	Liposomas	Factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF). Proteína de huso mitótico kinesina (KSP)	Vázquez-Vega <i>et al.</i> , 2010
Cáncer	Liposomas	Factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF)	Al-Mahmood <i>et al.</i> , 2018
Cáncer	Liposomas	Genes involucrados en angiogénesis	Ubby, I. <i>et al.</i> 2019
Cáncer	Liposomas	Gen supresor de tumores P53	Aleku <i>et al.</i> , 2008
Hepatitis C	diversos vectores	Región 5' no traducida del gen core (5'UTR)	Yokota <i>et al.</i> , 2003
Hepatitis C	Liposomas	Genes NS3, NS4B y NS5B	Wilson, J. <i>et al.</i> 2003
Hepatitis C	Liposomas	Genes NS3, NS4B y NS5B	Ray <i>et al.</i> , 2009
HIV	Liposomas	Genes requeridos para la infección y replicación del HIV-1	Corbeau, 2008

ENFERMEDAD	VECTOR	RNAM BLANCO	AUTOR
HIV	Liposomas	Genes virales tat, rev, gag, pol, nef, vif, env, vpr	Lee <i>et al.</i> , 2002
HIV	Oligofectamina	Genes P24, CD4, CD19	Novina <i>et al.</i> , 2002
HIV	Liposomas	Genes CCR5, CXCR4 y gp120	Surabhi <i>et al.</i> , 2002
HIV	Vectores lentivirales	Genes virales tat y rev	Michienzi <i>et al.</i> , 2003
HIV	Vectores retrovirales	Ribozymas anti-HIV-1	Amado <i>et al.</i> , 2004
Virus syncytial	ALN-RSV01	Proteína de la nucleocapside viral	Zamora <i>et al.</i> , 2011

Conclusiones

El descubrimiento del mecanismo de control de la expresión de genes a través de moléculas de siRNA ha venido a revolucionar el estudio de la expresión de genes surgiendo una nueva área de investigación conocida como Genómica Funcional.

Hoy en día los científicos son capaces de introducir moléculas de siRNA contra un RNAm específico a las células, reduciendo significativamente la producción de la proteína codificada en ese gen. A través del bloqueo de la expresión de una proteína con esta tecnología hemos podido conocer su función exacta dilucidar su papel en el desarrollo de una enfermedad ya sea genética, multifactorial o infecciosa.

El uso de moléculas de siRNA se ha convertido en un método confiable, estandarizado, rápido y barato en el bloqueo de la expresión génica comparado con otros métodos más costosos, como son la generación de organismos knock out. En este capítulo presentamos algunos ejemplos del uso exitoso de moléculas de siRNA tanto en enfermedades genéticas como adquiridas, por lo que la aplicación de moléculas de siRNA se convierte en un campo clínico prometedor para el tratamiento de muchas enfermedades que no cuentan con tratamiento efectivo.

Referencias

- Al-Mahmood, S., Sapiezynski, J., Garbuzenko, O. B. y Minko, T. (2018). Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. *Drug delivery and translational research*, 8, 1483-1507.
- Araujo, R. N., Santos, A., Pinto, F. S., Gontijo, N. F., Lehane, M. J. y Pereira, M. H. (2006). RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect biochemistry and molecular biology*, 36(9), 683-693.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215-233.
- Bartlett, D. W. y Davis, M. E. (2006). Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic acids research*, 34(1), 322-333.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R. y Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 296(5567), 550-553.
- Cech, T. R. y Steitz, J. A. (2014). The noncoding RNA revolution—trashing old rules to forge new ones. *Cell*, 157(1), 77-94.
- Endoh, T. y Ohtsuki, T. (2009). Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape. *Advanced drug delivery reviews*, 61(9), 704-709.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. y Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811.
- Fitzgerald, K., Frank-Kamenetsky, M., Shulga-Morskaya, S., Liebow, A., Bettencourt, B. R., Sutherland, J. E. y Simon, A. (2014). Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *The Lancet*, 383(9911), 60-68.
- Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G. J. y Carmell, M. A. (2006). A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 442(7099), 199-202.
- Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., Peng, L., Huang, Y., Zhao, Y. y Liang, X. J. (2020). Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 101.
- Jiang, J., Zhang, X., Tang, Y., Li, S. y Chen, J. (2021). Progress on ocular siRNA gene-silencing therapy and drug delivery systems. *Fundamental & clinical pharmacology*, 35(1), 4-24.

- Jinek, M. y Doudna, J. A. (2009). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, 457(7228), 405-412.
- Kim, D. H. y Rossi, J. J. (2007). Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nature Reviews Genetics*, 8(3), 173-184.
- Lee, N. S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M. J., Ehsani, A. y Rossi, J. (2002). Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nature biotechnology*, 20(5), 500-505.
- Matzke, M. A. y Birchler, J. A. (2005). RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nature Reviews Genetics*, 6(1), 24-35.
- Napoli, C., Lemieux, C. y Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The plant cell*, 2(4), 279-289.
- Nguyen, Q. D., Schachar, R. A., Nduaka, C. I., Sperling, M., Klammerus, K. J., Chibburis, K. y MONET Clinical Study Group. (2012). Evaluation of the siRNA PF-04523655 versus ranibizumab for the treatment of neovascular age-related macular degeneration (MONET Study). *Ophthalmology*, 119(9), 1867-1873.
- Pridgeon, J. W., Zhao, L., Becnel, J. J., Strickman, D. A., Clark, G. G. y Linthicum, K. J. (2014). Topically applied AaeIAP1 double-stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti*. *Journal of medical entomology*, 45(3), 414-420.
- Ray, R. B. y Kanda, T. (2009). Inhibition of HCV replication by small interfering RNA. *Hepatitis C: Methods and Protocols*, 251-262.
- Setten, R. L., Rossi, J. J. y Han, S. P. (2019). The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nature reviews Drug discovery*, 18(6), 421-446.
- Song, M. S. y Rossi, J. J. (2017). Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity. *Biochemical journal*, 474(10), 1603-1618.
- Tian, W. y Liou, H. C. (2009). RNAi-mediated c-Rel silencing leads to apoptosis of B cell tumor cells and suppresses antigenic immune response in vivo. *PloS one*, 4(4), e5028.
- Turner, C. T., Davy, M. W., MacDiarmid, R. M., Plummer, K. M., Birch, N. P. y Newcomb, R. D. (2006). RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect molecular biology*, 15(3), 383-391.
- Ubby, I., Krueger, C., Rosato, R., Qian, W., Chang, J. y Sabapathy, K. (2019). Cancer therapeutic targeting using mutant-p53-specific siRNAs. *Oncogene*, 38(18), 3415-3427.

- Vázquez-Vega, S., Contreras-Paredes, A., Lizano-Soberón, M., Amador-Molina, A., García-Carrancá, A., Sánchez-Suárez, L. P. y Benítez-Bribiesca, L. (2010). RNA de interferencia y su potencial terapéutico en cáncer. *Revista de investigación clínica*, 62(1), 81-90.
- Yan, Y., Liu, X. Y., Lu, A., Wang, X. Y., Jiang, L. X. y Wang, J. C. (2022). Non-viral vectors for RNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 342, 241-279.
- Zamora, M. R., Budev, M., Rolfe, M., Gottlieb, J., Humar, A., DeVincenzo, J. y Glanville, A. R. (2011). RNA interference therapy in lung transplant patients infected with respiratory syncytial virus. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 183(4), 531-538.
- Zhang, X., Goel, V., Attarwala, H., Sweetser, M. T., Clausen, V. A. y Robbie, G. J. (2020). Patisiran pharmacokinetics, pharmacodynamics, and exposure--response analyses in the phase 3 APOLLO trial in patients with hereditary transthyretin-mediated (hATTR) amyloidosis. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 60(1), 37-49.

Avances en medicina regenerativa y terapia celular

Luis Daniel Hernández Ortega

Eber Josué Carrillo Martínez

Héctor Fabián Nario Chaidez

Introducción a la terapia celular

Terapia es un término amplio utilizado en medicina. Esta palabra proviene del griego *therapeia*, que significa tratamiento, y está conformada por el verbo *therapeuein*, equivalente a cuidar, atender, aliviar, y el sufijo *-eia* variante de *-ia*, que indica cualidad. Analizando su raíz etimológica podemos comprender la amplitud de su significado, ya que no se limita a aquello que nos ayuda a “curar”, sino que abarca todos aquellos métodos utilizados para prevenir, manejar o resolver una enfermedad. Dado lo anterior, todo aquello que nos permita prevenir, aliviar síntomas, mejorar la función física o erradicar completamente la enfermedad puede ser considerado una terapia.

La terapia celular, particularmente, es una rama emergente de la medicina regenerativa que combina la biotecnología y la medicina para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades y lesiones. Esta terapia se basa en el uso de células vivas con la finalidad de reparar, reemplazar, regenerar o mejorar la función de tejidos y órganos dañados a través de diferentes estrategias.

En esencia, la terapia celular implica la administración de uno o más tipos de células, incluidas células indiferenciadas, troncales (también conocidas como células madre o células estaminales) o totalmente diferenciadas, como células del sistema inmune, queratinocitos o fibroblastos.

Aunque cada terapia puede estar enfocada en un fin diferente, fundamentalmente se les considera terapias no farmacológicas, sin embargo, guarda muchas similitudes con la terapia farmacológica, ya que tenemos que seleccionar la línea celular adecuada de acuerdo al efecto deseado, la dosis y la vía de administración más efectiva.

De acuerdo a su origen, las terapias pueden ser de tipo autólogo (proceden del propio paciente) o alogénico (proceden de un donante). En la mayoría de los casos para que la terapia sea posible las células deberán ser aisladas y expandidas mediante cultivos celulares para llegar a las dosis terapéuticas, ya que al igual que en la terapia farmacológica existe una ventana terapéutica y una dosis efectiva.

El desarrollo de la terapia celular ha sido posible gracias a avances significativos en la biología celular, la genética y la biotecnología, permitiendo aplicaciones en enfermedades como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares, entre otras.

Cabe señalar que el éxito de cualquier terapia depende de diversos factores, comenzando por un diagnóstico preciso, la elección cuidadosa del abordaje terapéutico (tipo celular, dosis, vía de administración) y de un monitoreo cercano para evaluar la eficacia y ajustar el tratamiento, según sea necesario; aunado a la participación activa del paciente, la adherencia al tratamiento y la comunicación abierta con los responsables de su seguimiento.

Clasificación

Si bien, el concepto de terapia celular abarca el uso de cualquier tipo de célula como agente efector, al hablar de terapia celular, lo primero que nos viene a la mente son las palabras “célula madre”, que abarca a un conjunto de células con características particulares cada una de ellas.

Las palabras célula madre hacen referencia a células no diferenciadas, que dependiendo de los estímulos recibidos dan origen a células de diversas estirpes, también es utilizado el término célula estaminal y el término célula troncal, palabra que deriva del inglés *stem cell*. Las células madre presentan dos características principales: 1) son indiferenciadas, con capacidad de

autorrenovación ilimitada o prolongada, esto es, pueden dividirse muchas veces sin diferenciarse; y 2) presentan capacidad de diferenciación hacia otros linajes celulares.

Uno de los sistemas de clasificación de las células madre hace referencia a su capacidad de diferenciación dividiéndolas en: totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes o progenitoras. La célula totipotente por excelencia es el cigoto y es capaz de dar origen a tejidos embrionarios y extraembrionarios. Las células pluripotentes son obtenidas de un embrión en etapa de blastocisto y no pueden dar origen a tejidos extraembrionarios, pero sí a cualquier célula somática. Las células multipotentes, por su parte, poseen una capacidad de diferenciación que se restringe a tipos celulares derivados de la misma capa embrionaria y, por último, las células unipotentes o progenitoras son aquellas capaces de derivar a un único tipo celular (véase figura 1).

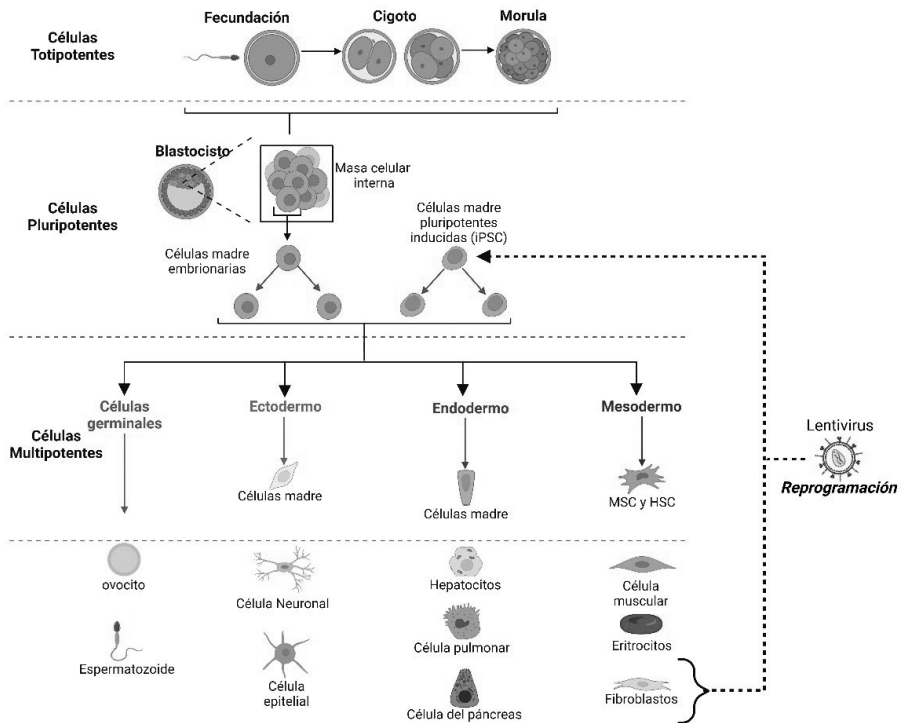
Las células madre también pueden ser clasificadas de acuerdo a su fuente en dos grandes grupos, las células madre embrionarias que comúnmente son obtenidas de la fase de blastocisto dentro de los 5-7 días postfecundación y las células madre adultas que son aisladas de tejidos totalmente desarrollados, como médula ósea, pulpa dentaria, cordón umbilical, placenta, tejido adiposo, entre otros.

En los tejidos adultos se encuentran una variedad importante de células madre, como las células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales y células madre epiteliales, cada una de ellas con capacidades de proliferación y diferenciación diferentes.

Por otra parte, a partir de los tejidos adultos es posible generar células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, por sus siglas en inglés, *induced pluripotent stem cells*); estas se generan reprogramando células somáticas adultas para que regresen a un estado pluripotente.

Es importante resaltar que tanto las células totipotentes como las pluripotentes no se administran como terapia directa, su uso comúnmente se restringe al modelaje *in vitro* de enfermedades y en últimas fechas a la ingeniería de tejidos, en parte a su capacidad de producir teratomas en el cuerpo y a la fuerte respuesta inmunológica que pueden despertar, así como a los dilemas éticos y legales que representa su uso.

FIGURA 1. CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE DE ACUERDO A SU POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN



Modelaje *in vitro* de enfermedades

El modelaje *in vitro* de enfermedades tiene como principal objetivo desarrollar modelos donde se recrean condiciones patológicas específicas en entornos controlados, facilitando a los investigadores el estudio de los mecanismos subyacentes de las enfermedades, como las alteraciones moleculares o los cambios genéticos que influyen en el desarrollo o en la severidad de la enfermedad, a su vez permitiendo identificar nuevas dianas terapéuticas y evaluar la eficacia de posibles tratamientos.

Uso de células embrionarias

Las células embrionarias obtenidas de la masa celular interna del blastocisto se clasifican como pluripotentes, lo que significa que tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier célula de las tres capas germinales, pudiendo dar origen a cualquier célula de tipo somático con los estímulos adecuados. Esta característica las convierte en una herramienta valiosa para el desarrollo de modelos de enfermedad, con sus respectivas controversias éticas y restricciones legales debido al origen de las mismas.

Estas células pueden ser modificadas genéticamente para portar mutaciones específicas asociadas a enfermedades genéticas, lo que permite el estudio de los efectos de estas mutaciones a nivel celular y molecular; al mismo tiempo, el modelo desarrollado puede ser utilizado para probar directamente fármacos experimentales, disminuyendo el tiempo y el costo necesarios para la selección de los fármacos más prometedores.

Clonación terapéutica

La clonación terapéutica, también conocida como transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, por sus siglas en inglés, *somatic cell nuclear transfer*), implica la creación de células madre embrionarias a partir de un núcleo celular del paciente y un óvulo al que previamente se le extrajo su pronúcleo. Una vez combinados se estimula para que comience a dividirse y formar un blastocisto, del cual se obtienen células en los 5 o 7 días posteriores que se pueden diferenciar en células o tejidos específicos. Este proceso tiene el potencial de generar células que son genéticamente idénticas a las del paciente, lo que reduce significativamente el riesgo de rechazo inmunológico cuando el objetivo es el desarrollo de tejidos o líneas celulares que serán usados directamente en el paciente (véase figura 2).

Al igual que las células embrionarias, éstas pueden ser empleadas para estudiar enfermedades *in vitro* o probar el efecto de fármacos con la ventaja de que los resultados observados en las células sean los esperados en el paciente,

debido a que poseen su misma carga genética, permitiendo la realización de terapias personalizadas y el desarrollo de la farmacogenética.

Las desventajas de la generación de este tipo de modelos es su complejidad técnica y sus altos costos, además de la existencia de controversias éticas similares a las del uso de células embrionarias.

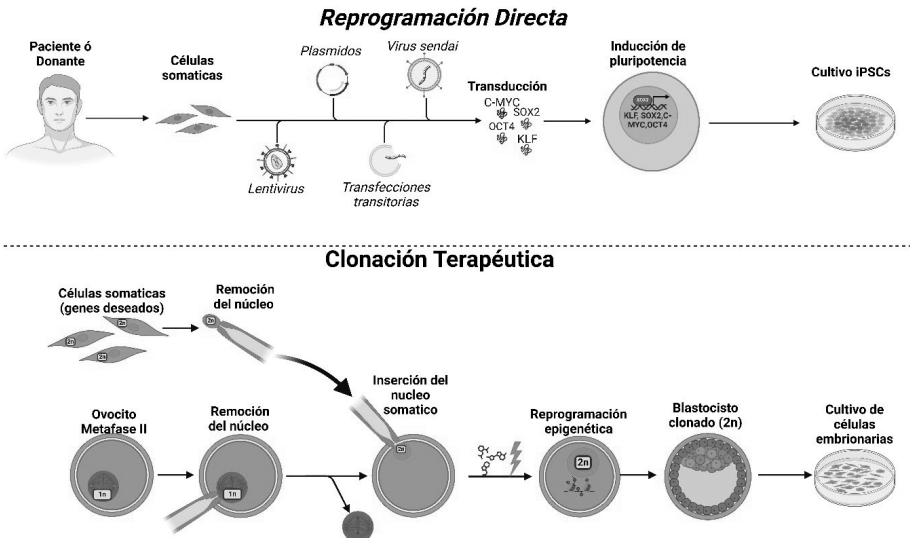
Uso de células troncales pluripotentes inducidas

En la actualidad existen diversos protocolos para la producción de iPSCs, variantes enfocadas en disminuir el riesgo de inserciones aleatorias y con ello el riesgo de mutagénesis insercional. Algunas de estas tecnologías son las transfecciones transitorias únicas o múltiples, vectores no integrantes, vectores escindibles, transducción directa de proteínas, virus Sendai basados en ARN, administración de factores de transcripción basados en ARNm y transfecciones de microARNs.

El procedimiento estándar de reprogramación fue diseñado por Shinya Yamanaka, logro por el cual fue galardonado con el Premio Nobel en Medicina en 2012. El protocolo se realiza mediante la introducción de cuatro factores de transcripción específicos (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc) mediante vectores virales a cultivos primarios de fibroblastos, los cuales pueden ser obtenidos mediante biopsia de piel del paciente; una vez que estos se comienzan a expresar dentro de los fibroblastos, comienza un proceso de desdiferenciación celular, lo que genera cambios morfológicos y colonias definidas de células iPSCs (véase figura 2).

Este proceso evita las controversias éticas y legales asociadas al uso de células embrionarias y ofrece una fuente potencialmente ilimitada de células pluripotentes que pueden ser generadas a partir de células del paciente, presentando los mismos beneficios que las células generadas por clonación terapéutica.

FIGURA 2. TÉCNICAS PARA LA GENERACIÓN DE CÉLULAS PLURIPOTENTES, REPROGRAMACIÓN DIRECTA PARA LA PRODUCCIÓN DE IPSCS Y CLONACIÓN TERAPÉUTICA PARA EL AISLAMIENTO DE CÉLULAS EMBRIONARIAS



Uno de los primeros ensayos de lo hoy conocido como *disease in a dish* (enfermedad en un plato) fue el de Ebert y colaboradores, quienes en 2009 desarrollaron dos líneas de iPSCs: una de un paciente con atrofia muscular espinal (AME), enfermedad causada por una disminución en la proteína de supervivencia de la neurona motora (SNM), y otra de un pariente no afectado con la enfermedad, con quien diferenciaron estas células en neuronas motoras.

En este modelo se logró reducir el número de neuronas motoras en los cultivos provenientes del paciente con AME, demostrando que el proceso de reprogramación y diferenciación dirigida reprodujo fielmente el fenotipo de la enfermedad. Posteriormente, dos compuestos fueron probados en los cultivos, el ácido valproico y la tobramicina, los cuales aumentaron la cantidad de estructuras ricas en la proteína SNM en las células obtenidas del paciente. Estos primeros experimentos proporcionan un panorama general de uno de los potenciales usos de las iPSCs.

En cuanto a la ingeniería de tejidos, una de las enfermedades en las que existen mayores avances es la insuficiencia cardíaca. En 2024 Miyagawa y colaboradores desarrollaron un parche de tejido diferenciando de iPSCs a cardiomiocitos, el cual está enfocado en mejorar el músculo cardíaco dañado disminuyendo la insuficiencia cardíaca.

En su investigación encontraron que las iPSC diferenciadas no solo expresaron genes y proteínas específicos de cardiomiocitos, si no que los análisis electrofisiológicos mostraron que exhiben propiedades similares a las de las células de miocardio primario humano. Sus estudios de seguridad *in vitro* e *in vivo* demostraron ausencia de células tumorigénicas y de mutaciones, evidenciadas por la secuenciación del genoma completo. En pruebas preclínicas en modelos animales de cerdos, no se observaron eventos adversos postrasplante, ni arritmias letales y se mejoró significativamente la función cardíaca y la angiogénesis.

Protocolos clínicos de terapia celular

Terapias con células troncales hematopoyéticas

La terapia de reemplazo con células hematopoyéticas es un procedimiento utilizado para tratar diversas enfermedades hematológicas, inmunológicas y algunas formas de cáncer. Es uno de los procedimientos de terapia celular con células madre más antiguos; los primeros fueron realizados en 1956 por el Dr. Edward Donnall Thomas, quien recibió el premio Nobel en fisiología y medicina en 1990 por sus descubrimientos relacionados al procedimiento.

El trasplante se realiza mediante la infusión de células madre hematopoyéticas (HSCs, por sus siglas en inglés, *hematopoietic stem cells*) con el objetivo de restaurar la capacidad del cuerpo de producir células sanguíneas saludables, las cuales pueden ser obtenidas mediante aspiración de médula ósea, movilización de HSCs (se administran medicamentos para movilizar las HSCs a sangre periférica y se aíslan por aféresis) o por aislamiento de sangre de cordón o placenta al momento del nacimiento.

Las HSCs son células multipotentes que residen en la médula ósea y tienen la capacidad de diferenciarse en todos los linajes de células sanguíneas, tanto línea roja como línea blanca y plaquetas. Son esenciales para el mantenimiento y la regeneración del sistema sanguíneo e inmunológico, asegurando un suministro constante de células a lo largo de la vida.

Indicaciones

Este procedimiento está indicado en enfermedades hematológicas, como la leucemia mieloide aguda (LMA) y la leucemia linfoblástica aguda (LLA), donde las células cancerosas invaden la médula ósea y afectan la producción normal de células sanguíneas. También se indica en linfomas, como el linfoma de Hodgkin y el linfoma no Hodgkin, que afectan el sistema linfático y la producción de células inmunitarias, y en enfermedades donde la médula ósea no produce suficientes células sanguíneas debido a fallos en las HSCs, como la anemia aplásica. Además, pueden ser utilizadas en enfermedades inmunológicas, como las inmunodeficiencias primarias, por ejemplo, la inmunodeficiencia combinada severa y en el tratamiento de los errores innatos del metabolismo donde pueden suplir el defecto enzimático subyacente.

Bioseguridad

El trasplante puede ser realizado de manera autóloga siempre y cuando el paciente cuente con HSCs recolectadas y almacenadas antes de presentar la patología, situación que no es muy común. En cuanto al trasplante alogénico puede ser efectuado de un donante compatible, ya sea un familiar o un donante no emparentado.

El proceso en el que las células madre trasplantadas comienzan a producir nuevas células sanguíneas en la médula ósea del receptor generalmente ocurre entre dos a cuatro semanas después del trasplante. Durante ese tiempo es necesario monitorear al paciente ante posibles infecciones debido a la inmunosupresión, ya que los pacientes son susceptibles y requieren profilaxis antibiótica, antifúngica y antiviral. Además, es necesario monitorear

para descartar enfermedad de injerto contra huésped, una complicación del trasplante alogénico donde las células del donante atacan los tejidos del receptor, la cual puede ser manejada con inmunosupresores, como los corticosteroides.

Terapias con células troncales mesenquimales

Las células madre mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés, *mesenchymal stem cells*) son un tipo de célula descrita por primera vez como adherente al plástico y de morfología fibroblastoide, fueron aisladas de médula ósea y denominadas inicialmente como células formadoras de colonias fibroblastoides (CFU-F) en 1970 por A. J. Friednestein.

En ausencia de factores inductores estas células tienen la capacidad de proliferar *in vitro* produciendo clonas idénticas, mientras que al añadir ciertos factores a su medio de cultivo es posible diferenciarlas a diversas estirpes celulares.

En su forma no diferenciada presentan propiedades angiogénicas, condrogénicas, antiinflamatorias, antifibróticas e inmunomoduladoras, así como un amplio potencial de secreción de moléculas bioactivas, por lo que existe una fuerte atracción en la comunidad científica para su estudio relacionado con el tratamiento en enfermedades crónico degenerativas, específicamente: ortopédicas, geriátricas, metabólicas, cardiovasculares, neurodegenerativas y dérmicas.

Actualmente y desde el año 2006 existen criterios mínimos para determinar que una célula pueda ser clasificada como MSCs, según la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, por sus siglas en inglés). Estos criterios son:

1. Adherencia al plástico en condiciones normales de cultivo
2. Expresión de proteínas de superficie: CD90, CD73, CD105 y CD44, y a su vez ausencia de: CD34, CD45, CD19, CD14, CD79a y HLA-DR
3. Capacidad de diferenciación a osteoblastos, adipocitos y condrocitos

MSCs e inmunomodulación

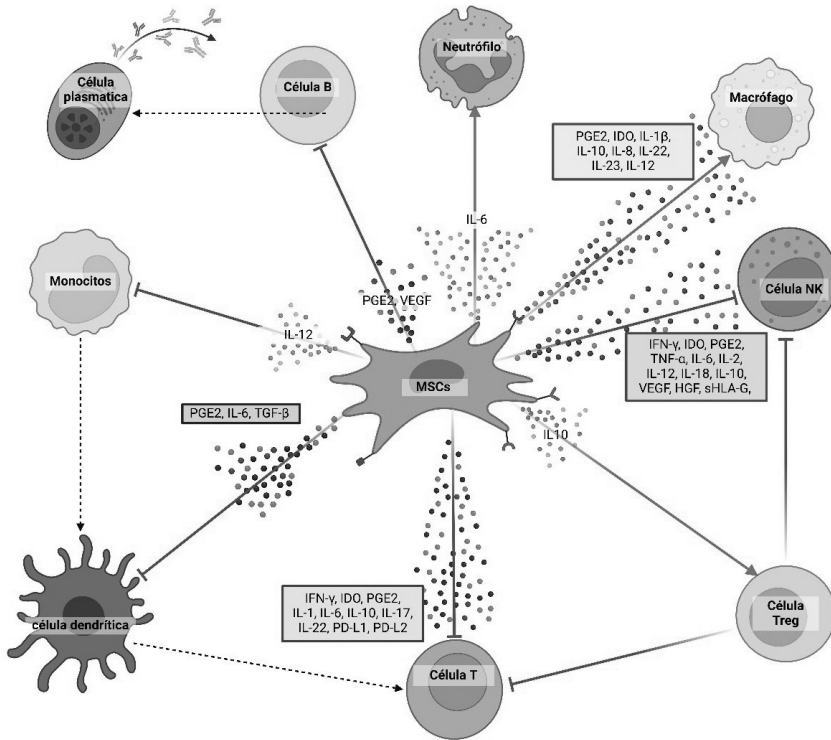
Las MSCs se han utilizado ampliamente en la terapia basada en células; desde la investigación básica hasta los ensayos clínicos, la seguridad y la efectividad se han documentado claramente en la mayoría de ensayos clínicos, especialmente en las enfermedades inflamatorias inmunomediadas, como la enfermedad de injerto contra huésped y el lupus eritematoso sistémico. Las MSCs secretan muchos tipos de citosinas por secreción paracrina, además de generar interacciones directas con las células inmunes, lo que conduce a la inmunomodulación.

Otra propiedad inmunorreguladora importante de las MSCs en el cuerpo es que responden a los procesos inflamatorios dirigiéndose hacia los tejidos afectados por la secreción de quimiocinas y citosinas inflamatorias. En una administración vía intravenosa, las células migrarán y se albergarán en los sitios de inflamación, donde responderán al microambiente y realizarán acciones inmunorreguladoras locales.

La utilidad terapéutica de las MSCs está asociada con su potencial regenerativo e inmunomodulador. Las MSCs son capaces de ejercer supresión inmunitaria y tolerancia inmunológica, lo que las convierte en candidatas óptimas para terapias celulares en el trasplante alogénico; además, las MSCs exhiben una expresión muy baja de antígeno leucocitario humano tipo 1 y ausencia del tipo 2. Se ha demostrado que las MSCs inducen la expansión de las células T reguladoras (Treg), lo que contribuiría a la supresión de las respuestas de los efectores a los aloantígenos. Por otra parte, no son capaces de generar respuestas inmunes *in vitro* en células T alogénicas, lo que sugiere que las MSCs poseen una baja inmunogenicidad específica, por lo que son bien toleradas en el trasplante alogénico.

Las MSCs no solo modulan la función de las células T, también lo hacen en las células B, naturales asesinas (NK) y dendríticas (DC) a través de diferentes mecanismos, principalmente por los factores solubles secretados (véase figura 3).

FIGURA 3. INTERACCIÓN DE LAS MSCs CON DIVERSAS CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE A TRAVÉS DE FACTORES SOLUBLES



Las flechas de color verde representan activación, mientras que las líneas rojas representan regulación negativa.

Las MSCs provocan una inhibición en la diferenciación de monocitos a DC y regulan negativamente la expresión de varias moléculas de presentación (HLA-DR, CD1a), moléculas coestimuladoras (CD80, CD83 y CD86) y citosinas como la IL-12.

En el caso de las células B, efectos contrarios han sido descritos; algunos estudios demuestran que las MSCs pueden regular las funciones de las células B, incluidas la migración, la proliferación y la síntesis de inmunoglobulina (IgM, IgA e IgG). Mientras que otros estudios han demostrado que las MSCs pueden estimular realmente la secreción de IgG e inducir la proliferación de células B.

Por otra parte, la supresión de la función de las células NK mediada por MSCs incluye la inhibición de la proliferación, la secreción de citosinas y, en algunos casos, la citotoxicidad. Mientras tanto, el IFN- γ protege parcialmente a las MSCs del ataque citolítico de las NK.

Estos efectos inmunorreguladores de las MSCs se producen en un entorno tisular localizado y no sistémico, diferente a la terapia con esteroides donde la supresión sistémica puede conducir a complicaciones clínicas mayores. Sin embargo, no todas las líneas de MSCs poseen las mismas capacidades inmunomoduladoras, por ejemplo, las MSCs aisladas de la gelatina de Wharton producen mayores cantidades de interleucina 10 y TGF- β en comparación con las aisladas de médula ósea.

Estas diferencias son posiblemente resultado de cambios epigenéticos propiciados por el microambiente del nicho del que fueron aisladas, cambios que también podemos ver reflejados en su capacidad de diferenciación, que de acuerdo al origen presentarán mayor facilidad de diferenciarse a un tejido en específico.

MSCs y medicina regenerativa: papel del secretoma

De manera previa, los efectos terapéuticos de las MSCs eran atribuidos a la capacidad de diferenciación celular en el sitio de la lesión, sin embargo, se ha demostrado que el porcentaje de células que llegan a la lesión y su diferenciación celular suele ser bajo *in vivo*, y a pesar de que aún falta información respecto a los mecanismos de acción, en los últimos años se ha presentado evidencia de que un porcentaje mayoritario de estas células no logran situarse en el sitio de la lesión debido a su retención en bazo, hígado y pulmones.

Investigaciones actuales atribuyen los efectos clínicos de las MSCs a su función paracrina, que se suscita mediante la interacción y secreción de factores solubles, así como la liberación de vesículas extracelulares de la propia célula (exosomas y microvesículas), las cuales además de contener factores de crecimiento e interleucinas, contienen miRNAs pequeñas moléculas de ARN (21-23 nucleótidos) no codificantes para proteínas, constituyen una extensa familia de genes reguladores postranscripcionales, implicados en la regulación de varios procesos biológicos, como la diferenciación celular, la proliferación, la apoptosis y en el desarrollo embrionario y tisular (véase tabla 1).

TABLA 1. ALGUNOS DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO, PROTEÍNAS INMUNOMODULADORAS Y MIRNAS REPORTADOS COMO PARTE DEL SECRETOMA DE LAS MSCS

Factores de crecimiento	BDNF factor neurotrófico derivado del cerebro, factor de crecimiento de fibroblastos básico bFGF, BMP proteína morfogenética ósea, factor de crecimiento epidérmico EGF, receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR, FGF-7 factor de crecimiento de fibroblastos-7, GDF-15 factor de crecimiento/ diferenciación-15, GDNF factor neurotrófico derivado de células gliales, hormona de crecimiento GH, HGF factor de crecimiento de hepatocitos, MCSF R factor estimulante de colonias de macrófagos, NGF R receptor del factor de crecimiento nervioso, NT-3 neurotrofina-3, factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF, factor de células madre SCF, TGFβ1 factor de crecimiento transformante beta 1, TGFβ3 factor de crecimiento transformante beta 3, VEGF factor de crecimiento endotelial vascular.
Proteínas inmunomoduladoras	Quimiocina de linfocitos BLC B/CXCL13, eotaxina, G-CSF factor estimulante de colonias de granulocitos, interferón gamma, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, MCP-1 proteína quimiotáctica de monocitos-1, MCSF factor estimulante de colonias de macrófagos, MIP-1α proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa, MIP- 1β proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta, TIMP-1 inhibidor tisular de metaloproteasa-1, TMP-2 inhibidor tisular de metaloproteasa-2, TNFa factor de necrosis tumoral alfa.
miRNAs	miR-17-5p, miR-21, miR-1, miR-15a, miR-29a, miR-196a, miR-141, miR-18a, miR-31, miR-21, miR-15b, miR-29b, miR-200b, miR-34a, miR-203, miR-23a, miR-16, miR-29c, miR-200c, miR-106b, miR-204, miR-29b, miR-17, miR-192, miR-181a, miR-205, miR-126, miR-17-92, miR-181b, miR-210, miR-133a, miR-20a, miR-193b, miR-133b, miR-20b, miR-210, miR-146a, miR-21, miR-221, miR-210, miR-29, miR-222, miR-218, miR-92a, miR-377, miR-98, miR-939, miR-101, miR-4530, miR- 126, miR-130a, miR-141, miR-184, miR-185, miR-200b, miR-203, miR-205, miR-206, miR-210, miR-221, miR-222, miR-296, miR-320a, miR-320b, miR-378a.

La creación de tratamientos optimizados, partiendo de las características del secretoma de cada línea celular, pueden determinar una diferencia en la terapia celular, ya que diversas moléculas presentes en las MSCs han mostrado

propiedades diferentes, lo que genera beneficios diversos y con ello diversas aplicaciones; no obstante, previamente a asegurar que estos hallazgos implican la creación de terapias dirigidas a diversas patologías, se debe considerar que el papel de las MSCs es complejo y que estas células interactúan luego de la aplicación, con miles de moléculas y células, ya que también pueden promover la regeneración de tejidos mediante el reclutamiento de células troncales endógenas a los sitios de lesión, así como señalizar la diferenciación local de las células troncales.

Protocolos clínicos

El crecimiento del interés científico en las MSCs ha ido en aumento desde su descubrimiento, mismo que alcanza un pico durante la pandemia. Después de realizar una búsqueda rápida en el sistema PubMed de la National Library of Medicine, encontramos que se publicaron 8562 artículos científicos en torno a las MSCs tan solo en 2021; de la misma manera al realizar una búsqueda en la plataforma ClinicalTrials.gov encontramos 1475 protocolos clínicos registrados tan solo en este sistema.

Dadas las amplias propiedades de las MSCs como angiogénicas, antiinflamatorias, antifibróticas e inmunomoduladoras y a la secreción de un gran número de moléculas bioactivas como factores de crecimiento, interleucinas y miRNAs, existe una gran variedad de enfermedades entre los registros de los protocolos clínicos, pero principalmente la mayoría de origen crónico degenerativo o de tipo inmunológico.

Aunque la información encontrada sobre la dosis suele ser muy heterogénea, ya que depende del objetivo de la terapia y la vía de administración, las dosis más comúnmente encontradas son: para la vía intravenosa de 100 a 200 millones (o en otros casos de 1.5 a 2.0 millones por kilogramo de peso), vía intraarticular en rodilla de 30 a 50 millones y vía intratecal de 25 a 50 millones.

Algunos de los protocolos que podemos encontrar registrados son: *Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Refractory Acute Graft-versus-host Disease* de Guangzhou, Guangdong, China, con el registro NCT01765634; *Allogenic Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Progenitor Cells for the Treatment of Knee*

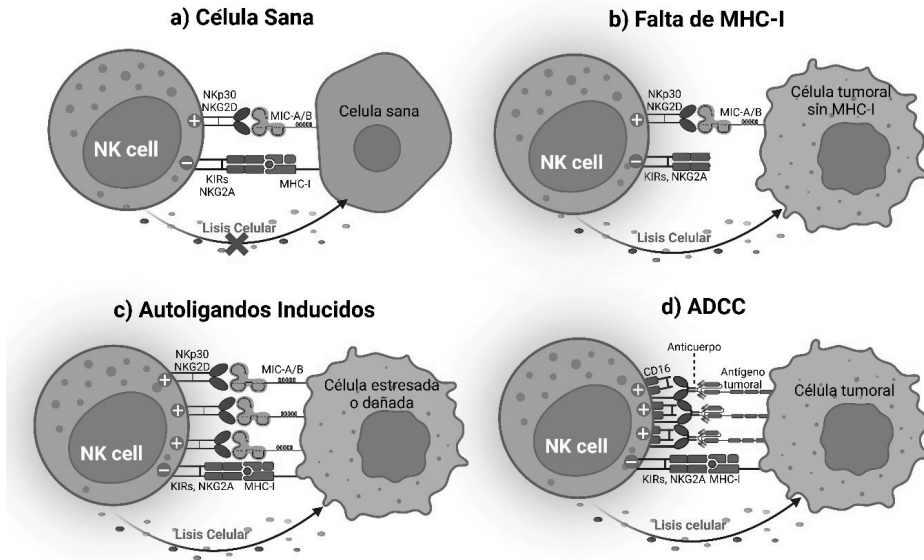
Osteoarthritis, Beijing, China, con el registro NCT04208646; *Mesenchymal Stem Cell Based Therapy for the Treatment of Osteogenesis Imperfecta*, Barakaldo, Bizkaia, España, con el registro NCT02172885; y *Clinical Study on Mesenchymal Stem Cells Used in the Reconstruction Surgery of the Supraspinatus Muscle Lesions* de Znojmo, República Checa.

Mientras tanto, protocolos registrados con participación de investigadores mexicanos encontramos solo doce, ocho de ellos con investigador principal a Chadwick Pródromos, médico de la Foundation for Orthopaedics and Regenerative Medicine, en colaboración con investigadores de St. John's, Antigua y Barbuda y Buenos Aires. De los cuatro protocolos restantes, uno de ellos está enfocado en osteoartritis y tres más en trastornos relacionados a COVID-19; uno de ellos realizado por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran, titulado *Mesenchymal Stem Cell for Acute Respiratory Distress Syndrome Due for COVID-19* con el número de registro NCT04416139 cuenta con resultados publicados en abril de 2021 en el artículo científico *Mesenchymal Stem Cells for the Compassionate Treatment of Severe Acute Respiratory Distress Syndrome Due to COVID 19*.

Terapias con células asesinas naturales (*natural killer*)

La terapia celular con células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés) ha emergido como una estrategia prometedora en el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo cáncer y enfermedades virales. A diferencia de las células T, las células NK no requieren una correspondencia precisa con un antígeno específico para reconocer y atacar a las células cancerosas. En cambio, las células NK tienen la capacidad de reconocer patrones característicos de las células anormales, como la pérdida de moléculas inhibitoras o la expresión excesiva de moléculas activadoras; esta característica facilita su actividad frente a un gran número de cánceres humanos (véase figura 4).

FIGURA 4. RECONOCIMIENTO INMUNOLÓGICO DE LAS CÉLULAS NK



a) La NK reconoce a la célula como una célula sana, b) la célula NK activa el mecanismo de lisis o rotura celular al no reconocer a célula tumoral como propia debido a la ausencia de MHC-I, c) se produce lisis en la célula dañada porque el balance entre receptores activadores e inhibidores se inclina en la activación de la NK y d) la célula NK se activa debido al reconocimiento de anticuerpos tumorales por parte de los receptores activadores CD16, proceso denominado *antibody-dependent cell cytotoxicity* (ADCC).

Una de las ventajas de la terapia con NK es el menor riesgo de efectos secundarios graves en comparación con otras inmunoterapias, además de la posibilidad de realizar terapias alogénicas, lo que facilita la obtención y almacenamiento de las mismas. Las desventajas incluyen la necesidad de activar y expandir las células NK en el laboratorio antes de la administración y la posible resistencia de los tumores a la actividad de las células NK.

La activación de las células busca incrementar la actividad citotóxica de las NK, clásicamente se pueden utilizar de manera individual o cocteles de TNF- α , IFN γ , perforinas, granzimas, IL-2, 12, 15, 18 y 21, con la finalidad de incrementar la citotoxicidad natural de las células incrementando la expresión de sus marcadores CD16 y disminuyendo CD56. La eficacia de estos procedimientos puede ser mediada a través de análisis de los niveles de proteínas de activación KLRG1, CD27 y Sca1.

Protocolos clínicos

A diferencia de la terapia celular con MSCs, la terapia con NKs cuenta con apenas 425 protocolos registrados, la mayoría de ellos en fase 1 y fase 2, y solo 9 en fase 3, por ejemplo, el protocolo *Maintenance Therapy With Autologous Cytokine-induced Killer Cells for Nonsquamous Non-small Cell Lung Cancer*, Nanning, Guangxi, China, con número de registro NCT01481259; sin embargo, en esta búsqueda no se encontró ningún protocolo registrado en México. Las dosis utilizadas en dichos protocolos son muy diferentes, dependiendo el tipo de patología a tratar, y van desde los 20 millones hasta los 2 billones de células.

Terapias con células CAR-T

Las células CAR-T son células T del propio paciente, que han sido modificadas genéticamente en el laboratorio para expresar un receptor de antígeno quimérico en su superficie (CAR, por sus siglas en inglés). Este receptor es una proteína artificial que combina una región de reconocimiento de antígeno, generalmente un anticuerpo monoclonal, con dominios de señalización intracelular de las células T, combinando la capacidad de respuesta de las células T con la especificidad de los anticuerpos monoclonales, lo que permite a las células CAR-T identificar y atacar selectivamente las células cancerígenas que expresan el antígeno específico reconocido por el CAR.

Las modificaciones genéticas necesarias en la generación de las células CAR-T, así como las modificaciones extra que pueden ser realizadas para incrementar la tasa de éxito de la terapia (CAR-T de tercera generación), se realizan mediante la tecnología de CRISPR-CAS9, misma que será descrita con más detalle en el capítulo 11 de esta obra.

Bioseguridad

Si bien las terapias con células CAR-T ofrecen una nueva esperanza para muchos pacientes con cáncer, también plantean desafíos éticos y de seguridad. El alto costo de estas terapias puede limitar su acceso a ciertos grupos de pacientes.

Además, pueden surgir efectos secundarios graves, como la liberación de citocinas excesiva, que puede causar una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), un síndrome de liberación de citosinas (CRS) o el síndrome de neurotoxicidad asociada a células efectoras inmunitarias (ICANS), y en muy raras ocasiones el síndrome similar a la linfohistiocitosis hemofagocítica asociada a células efectoras inmunitarias. Estas manifestaciones clínicas ocurren cuando las células CAR-T liberan grandes cantidades de citoquinas, causando fiebre, hipotensión y disfunción orgánica, y requieren un manejo cuidadoso y controlado por parte del equipo médico.

Particularmente, el CRS e ICANS se manejan con el uso de medicamentos como tocilizumab (un inhibidor del receptor de IL-6) y esteroides para controlar la respuesta inflamatoria, sin embargo, la comprensión de las vías moleculares involucradas ha inspirado en ensayos clínicos en curso el uso del antagonista del receptor de IL-1, anticuerpos neutralizantes de IFN γ e IL-6 y de los inhibidores de la Janus quinasa, como el tofacitinib.

Protocolos clínicos

En una búsqueda rápida en clinicaltrials.gov, utilizando CAR-T cells en la pestaña de intervención o tratamiento, encontramos 1640 estudios registrados utilizando las palabras clave. La mayoría de estos estudios se encuentran en fase 1 (1083), pocos en fase 2 (532) y solo algunos en fase 3 (26); de esta búsqueda cabe destacar que existe un protocolo en fase 4, el protocolo de origen Chino tiene por título: *Anti- CD19:TCR ζ Chimeric Antigen Receptor-T Cells in the Treatment for CD19+ B Cell Lymphoma*, con número de registro NCT02992834.

La mayoría de los protocolos clínicos se encuentran enfocados en la modificación de PD-1 o CD-19, resaltando la existencia de dos terapias basadas en la modificación de células T para el reconocimiento del CD-19, molécula expresada comúnmente en células de linfoma, mismas que fueron aprobadas por la FDA entre 2017 y 2018, y llevan por nombre tisagenlecleucel (Kymriah) indicada para adultos con determinados tipos de linfoma no Hodgkin y axicabtagén ciloleucel (Yescarta), indicada para el tratamiento de linfoma difuso de células B grandes (LDCBG).

Bioética en la terapia celular (terapias autólogas y alogénicas)

La bioética es fundamental en la aplicación de cualquier tipo de terapia, pero en el caso de la terapia celular plantea importantes dilemas éticos que deben ser abordados. Las terapias celulares autólogas donde las células utilizadas son del mismo paciente, plantean principalmente cuestiones relacionadas con la privacidad, el consentimiento informado y la equidad en el acceso a los tratamientos, mientras que las terapias celulares alogénicas donde las células provienen de donantes, además de los anteriores, se plantean desafíos éticos adicionales, como la selección de donantes adecuados, la bioseguridad de las líneas celulares empleadas y la gestión de la compatibilidad entre donante y receptor. En ese sentido, los pacientes deben ser plenamente informados sobre los riesgos y beneficios de la terapia celular, por lo que deben de firmar un consentimiento informado que incluya la información detallada del procedimiento al que será expuesto.

Normatividad

Alrededor del mundo existen organismos que regulan la terapia celular, cada uno de ellos con normatividades específicas y con diversos alcances; de entre ellos sobresalen: en Estados Unidos de América la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés, Food and Drug Administration), en Europa la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) a través del Comité de Terapias Avanzadas (CAT), en Japón la Agencia de Productos Farmacéuticos y Dispositivos Médicos (PMDA), en Australia la Administración de Bienes Terapéuticos (TGA) y en China la Administración Nacional de Productos Médicos (NMPA), anteriormente conocida como CFDA.

México

En México el organismo correspondiente es la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (Cofepris), un organismo desconcentrado

de la Secretaría de Salud que tiene a su cargo el ejercicio de las atribuciones en materia de regulación, control y fomento sanitarios en los términos de la Ley General de Salud; como tal tiene la atribución para la vigilancia de establecimientos y expedición de licencias, incluyendo aquellas en torno a la medicina regenerativa y bancos celulares.

Sin embargo, al día de la escritura del presente capítulo, no cuenta con una normativa específica en torno a las terapias celulares; como antecedente se cuenta con el proyecto de norma oficial mexicana PROY-NOM-260-SSA1-2017 “Para la disposición de células troncales y progenitoras con fines terapéuticos y de investigación”, misma que al día de hoy no se ha aprobado ni publicado en el *Diario Oficial de la Federación*.

Recomendaciones de la OMS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) no regula directamente las terapias celulares, pero emite directrices y recomendaciones que desde ciertos enfoques pueden ser útiles para que los países puedan desarrollar sus propias normativas, las dos principales son:

- ♦ Guidelines on Good Manufacturing Practices for Biological Products
- ♦ Ethical Considerations for Human Cellular and Tissue-based Products

Conclusiones

Sin lugar a duda, la terapia celular se perfila como una opción novedosa en el tratamiento de diversas patologías. Sin embargo, a pesar de que los primeros antecedentes de terapia celular se remontan al siglo pasado, muy pocos de estos, como la terapia de remplazo con HSCs, han logrado establecerse como un procedimiento común. Avances significativos en la tecnología han permitido una disminución significativa en los precios del desarrollo de terapias celulares, y aunque de momento aún se encuentran por encima de la capacidad de pago del mexicano promedio, ya es posible que cierto sector de la población acceda a ellas. La existencia de un gran número de protocolos clínicos alrededor del

mundo y la aprobación de algunos de ellos por entidades como la FDA evidencia los beneficios obtenidos y la bioseguridad de este tipo de terapias. Por otra parte, los protocolos al ser tan heterogéneos en su diseño y al ser enfocados a patologías tan variadas, hacen necesario que las investigaciones continúen hasta poder estandarizar las mejores condiciones de respuesta y bioseguridad.

Referencias

- Behrouzian, G., Ahmadi, M. H., Gholamin, M., Amirfakhrian, R., Saberi, E., Karimi, M. A. y Hosseini, M. (2024). CRISPR-Cas9 technology: As an efficient genome modification tool in the cancer diagnosis and treatment. *Biotechnol Bioeng*, 121(2), 472-488. DOI: 10.1002/bit.28603. PMID: 37986642.
- Chen, J. Y., Mou, X. Z., Du, X. C. y Xiang, C. (2015). Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins. *Asian Pac J Trop Med*, 8(9), 739-46. DOI: 10.1016/j.apjtm.2015.07.022. PMID: 26433660.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Turner, S. C., Chen, K. S., Ghaheri, B. A., Ghayur, T., Carson, W. E. y Caligiuri, M. A. (2001). Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*, 97(10), 3146-3151. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.10.3146>
- Ebert, A. D., Yu, J., Rose, F. F. Jr., Mattis, V. B., Lorson, C. L., Thomson, J. A. y Svendsen, C. N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 457(7227), 277-80. DOI: 10.1038/nature07677.
- Gerdoni, E., Gallo, B., Casazza, S., Musio, S., Bonanni, I., Pedemonte, E., Mantegazza, R., Frassoni, F., Mancardi, G., Pedotti, R. y Uccelli, A. (2007). Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*, 61(3), 219-27. DOI: 10.1002/ana.21076. PMID: 17387730.
- Miyagawa, S., Kawamura, T., Ito, E., Takeda, M., Iseoka, H., Yokoyama, J., Harada, A., Mochizuki-Oda, N., Imanishi-Ochi, Y., Li, J., Sasai, M., Kitaoka, F., Nomura, M., Amano, N., Takahashi, T., Dohi, H., Morii, E. y Sawa, Y. (2024). Pre-clinical evaluation of the efficacy and safety of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte patch. *Stem cell research & therapy*, 15(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s13287-024-03690-8>

- Toubai, T y Hosokawa, Y. (2024). Recent advances in prevention and treatment of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Rinsho Ketsueki*, 65(5), 401-411. DOI: 10.11406/rinketsu.65.401. PMID: 38825520.
- Walton, Z. E., Frigault, M. J. y Maus, M. V. (2024). Current and emerging pharmacotherapies for cytokine release syndrome, neurotoxicity, and hemophagocytic lymphohistiocytosis-like syndrome due to CAR T cell therapy. *Expert Opin Pharmacother*, 25(3), 263-279. DOI: 10.1080/14656566.2024.2340738. PMID: 38588525.

Marcadores genéticos en la identificación humana

José Miguel Moreno Ortiz

José Alonso Aguilar Velázquez

Jorge Adrián Ramírez de Arellano Sánchez

Andrés López Quintero

Identificación humana

El proceso de identificación humana es complejo, particularmente en casos de desastres de masas, migración, conflictos armados y otras situaciones de violencia. Las acciones preliminares y el análisis de contexto son esenciales para la identificación de individuos, además, los procesos de búsqueda e identificación pueden combinar múltiples pasos y herramientas metodológicas que conducen a la clarificación del destino y/o paradero de una persona desaparecida o no identificada (viva o muerta).

La recolección, evaluación y análisis de la información, así como la formulación de hipótesis determinará la siguiente acción, por lo que el tipo de información que más comúnmente se emplea en la identificación humana es:

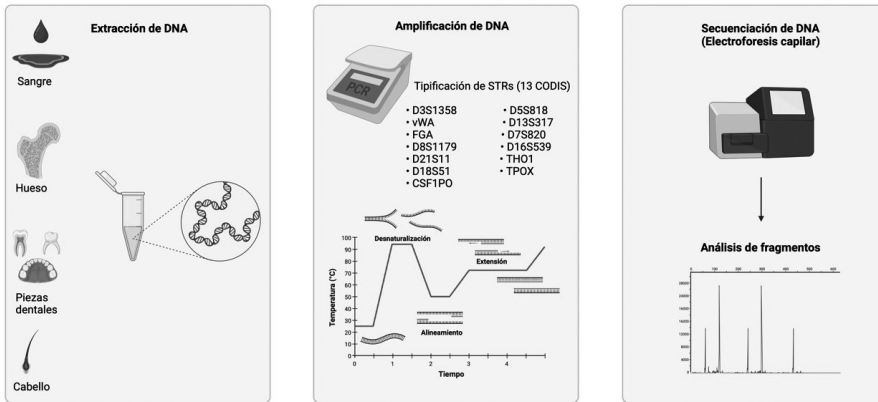
- ♦ Antecedentes e información del contexto de la investigación
- ♦ Reconocimiento visual
- ♦ Documentos e identificaciones
- ♦ Huellas dactilares
- ♦ Datos radiológicos
- ♦ Datos dentales
- ♦ Datos genéticos
- ♦ Perfil biológico e información física

- ◇ Características individuales (tatuajes, cicatrices, aretes, etc.)
- ◇ Condiciones médicas/salud
- ◇ Objetos personales y ropa

Por otro lado, existen indicadores biológicos como huellas latentes (huellas dactilares e impresiones de oreja), tejidos blandos (apariencia física, patología y trauma de tejidos blandos, intervenciones quirúrgicas, cabello y uñas), tejidos duros (odontología, osteología y radiografía) y aspectos faciales (antropología facial y reconstrucción, reconocimiento facial y análisis de imagen e identificación por medio de patrones de iris) que permiten confirmar la identidad de un individuo con un alto grado de certeza

Como parte de la identificación humana, el descubrimiento de la huella genética (*DNA fingerprinting*), realizado por Alec Jeffreys, permitió expandir el panorama en el área de las ciencias forenses a través del uso de secuencias repetidas en el DNA, con la posibilidad de incidir en casos criminales, de parentesco e inmigración. La metodología que empleó consistía en extraer DNA y generar fragmentos con enzimas de restricción, técnica conocida como RFLPs (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (véase figura 1). Está técnica se convirtió por mucho tiempo en el estándar de oro en los laboratorios forenses. En ese sentido, uno de los cambios más importantes en la búsqueda de marcadores moleculares para la identificación de individuos ocurrió con el análisis de fragmentos no codificantes de DNA, en las que se describió que las regiones variables consisten en repetidos en tándem de una secuencia corta (minisatélite), en donde la variabilidad resulta de diferencias en el número de repeticiones. Los modelos de mutación para estas regiones repetidas indican que los cambios ocurren como resultado de intercambios desiguales mitóticos o meióticos, o por el deslizamiento del DNA durante la replicación. La primera descripción de un minisatélite fue de cuatro repetidos en tándem de una secuencia de 33 pares de bases (pb), en un intrón del gen de la mioglobina, aunque posteriormente se identificaron una gran cantidad de regiones satélite a lo largo del genoma. Sin embargo, un aspecto en contra del análisis de ADN satélite por RFLPs es que se trata de una técnica laboriosa y lenta, que requería gran cantidad e integridad del DNA.

FIGURA 1. OBTENCIÓN DE UNA HUELLA GENÉTICA



La extracción de DNA para la determinación de una huella genética puede realizarse a través de distintas muestras biológicas, como sangre, hueso, dientes o cabello. Una vez que se obtiene el DNA se realizan múltiples copias del material genético a través de la técnica de PCR en formato multiplex (amplificación simultánea de varios loci en una misma reacción), para lo cual se requieren iniciadores específicos de las regiones a amplificar. Posteriormente, los fragmentos amplificados se colocan en un equipo de electroforesis capilar, donde se obtienen una serie de picos (alelos) que corresponden a los fragmentos amplificados durante la PCR y se determinan los genotipos para cada locus.

VNTRs y STRs

Los primeros métodos para la identificación de personas relacionados con la genética forense se dieron en la década de los sesenta, cuando se recurría a marcadores morfológicos, es decir, rasgos fenotípicos fáciles para identificar visualmente. Esto tenía algunas limitaciones debido a que la tecnología disponible en ese momento no era tan avanzada y no era un método concluyente en muchos de los casos. Más adelante surgieron otros métodos, dirigidos a la identificación de proteínas, dando mejores resultados, pero estas metodologías resultaron costosas y no podían aplicarse a otro tipo de moléculas.

Uno de los primeros marcadores usados para diferenciar individuos fueron los grupos sanguíneos. El inconveniente de este sistema es que no existen muchos grupos sanguíneos diferentes y gran parte de la población comparte el mismo que millones de otros individuos, por lo cual no es un marcador muy específico. Posteriormente, fueron usados marcadores bioquímicos y las inmunoglobulinas, pero estas no tienen tantas variantes polimórficas, por lo que tampoco son un marcador ideal para este propósito, ya que limita su aplicación. Posteriormente, surgió otro enfoque dirigido a marcadores genético-moleculares, que se transmiten de padres a hijos y varían de persona a persona, con lo cual se abre la posibilidad de una identificación más precisa. De la totalidad del DNA, menos del 3% forma proteínas, el resto es DNA no codificante, por lo que no tiene información que puede ser evidenciable fenotípicamente, lo que hace ideal a este sistema genético para que sea empleado en la identificación de personas, sin mostrar variaciones por condiciones médicas o morfológicas.

En el ámbito forense, el DNA no codificante es más informativo, principalmente porque casi la mitad de este es repetitivo y extremadamente polimórfico, por lo tanto, es diferente entre los individuos, razón por la cual es de vital importancia para la identificación de personas. Estas variantes pueden ser determinadas a través de la técnica de PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*), en la cual se amplifican las secuencias repetitivas de manera específica. Actualmente existen kits comerciales con los que es posible amplificar diversas secuencias en una misma reacción, lo cual optimiza los tiempos de análisis. Dependiendo de la longitud de las secuencias repetidas de ADN no codificante se clasifican de manera diferente, por ejemplo:

- ♦ Minisatélites: son secuencias repetidas en tándem de 6 a 25 pb.
- ♦ Microsatélites: son secuencias repetidas en tándem de 2 a 6 pb (véase figura 2).

Los VNTRs (*Variable Number Tandem Repeats*) son un tipo de minisatélites, que corresponden a secuencias no codificantes e hipervariables, con una secuencia de 6 a 25 nucleótidos, la cual es repetida un número variable de veces a lo largo del genoma. Debido a que hay alta variabilidad en el número de sus repeticiones, los VNTRs se convierten en un buen biomarcador genético para pruebas de identificación. No obstante, una limitación para el uso de los VNTRs es que se

requiere una muestra con cantidad y calidad óptimas para hacer un buen análisis, en contraste con el análisis de los microsatélites o también llamados STRs (*Short Tandem Repeats*), donde, al ser fragmentos más pequeños, menores cantidades de muestra pueden ser útiles para el análisis. Es por eso que los STRs son los marcadores de elección en identificación forense. Los STRs autosómicos se han convertido en un buen marcador genético-molecular debido a varias razones, entre las que destacan su abundancia en el genoma, su naturaleza polimórfica y su tamaño relativamente pequeño. Además, se pueden analizar varios STRs simultáneamente, lo cual optimiza el proceso y reduce tiempos de espera.

En función del número de nucleótidos que conforman la unidad de repetición, los microsatélites pueden ser dinucleótidos, trinucleótidos, etc. Existen las siguientes cuatro categorías de STRs con base en el patrón de repetición que presentan:

- ♦ Repeticiones simples: sus unidades de repetición están conformadas por la misma longitud y secuencia.
- ♦ Repeticiones compuestas: dos unidades de repetición tienen la misma longitud, pero diferentes secuencias.
- ♦ Repeticiones complejas: presentan algunos segmentos de repetición con longitud variable y secuencias variables intermedias.
- ♦ Repeticiones hipervariables complejas: existen numerosos alelos que varían en tamaño y en secuencia.

Desde los años noventa se comenzó a emplear a los siguientes STRs como marcadores en identificación humana: TH01, VWA, FES/FPS y F13A1. Posteriormente, en el año 1997 el FBI sugirió el uso de 13 STRs autosómicos para conformar el CODIS (*Combined DNA Index System*), que es la base de datos nacional empleada en Estados Unidos de América para realizar identificación genética en casos forenses. Sin embargo, para el año 2020 se decidió ampliar a 20 STRs la batería de marcadores del CODIS, con lo cual aumenta el poder de discriminación.

Por otra parte, los STRs presentes en los cromosomas sexuales han sido de vital importancia para establecer el sexo de las muestras analizadas. El gen de la amelogenina es un ejemplo de esto y es el más comúnmente usado para discriminar entre masculino y femenino. A pesar de que hay divergencias entre

el gen localizado en el cromosoma X (AMELX) del que está en el Y (AMELY), ambos se pueden amplificar simultáneamente con el mismo par de cebadores. Sin embargo, existen otros STRs que sirven para este propósito, tales como: SRY, TSPY, DXYS156 y STS. Los minisatélites y los microsatélites encontrados para cada par de cromosomas homólogos presentan una herencia mendeliana simple, por lo que una secuencia se hereda del padre y la otra de la madre. Gracias a esto se pueden establecer parentescos, tal como se hace en la prueba de paternidad.

INDELs/SNVs

Una variante de tipo INDEL es una secuencia en la cual se inserta o se elimina una porción de nucleótidos (véase figura 2), que modifica la longitud del segmento de DNA y se estima que representan del 16% al 20% de las variantes genéticas encontradas en el genoma humano. Estas son caracterizadas por ser bialélicas y ambos alelos pueden variar en sus secuencias. Debido a que es posible identificar INDELs en muestras con baja cantidad de DNA e incluso en estado de degradación avanzada, su estudio sirve para complementar el análisis de los STRs.

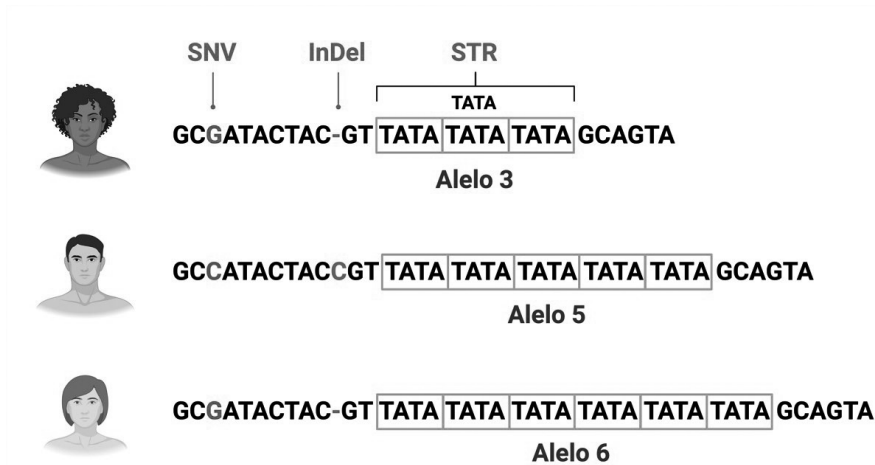
Recientemente, los INDELs han cobrado importancia en el ámbito forense porque ofrecen ventajas tales como facilidad de estandarización, bajo costo y la posibilidad de analizar muestras cuya calidad e integridad no son óptimas, como sucede en la mayoría de los casos forenses. Además, al ser autosómicos, aportan información de filiación, ya que ofrecen información proveniente de los progenitores.

Las variantes de un solo nucleótido (*single nucleotide variants*) son cambios de un nucleótido en una posición puntual (véase figura 2). Se estima que se presentan en 1 de cada 1000 pb. El uso de SNVs en DNA no codificante ha sido previamente documentado y utilizado con propósitos forenses. Al igual que los INDELs son bialélicas, razón por la que no ofrecen el nivel de discriminación que un panel de STRs y por eso no sustituyen su análisis, sino que lo complementan. Bajo algunos contextos en los que la muestra está degradada o no contiene suficiente cantidad de DNA, el análisis por INDELs o SNVs es de gran ayuda.

No se sabe con certeza si los SNVs serán en el futuro mejor elección que los STRs; sin embargo, hay algunas ventajas que ofrecen, por ejemplo: una baja tasa de mutación, analizables en amplicones (fragmentos) pequeños y detectables

con tecnologías de alta resolución, esto último es elemental para el estudio de poblaciones a gran escala. Desafortunadamente, para tener el mismo impacto estadístico, son necesarios 5 SNVs para igualar a 1 STR, por lo que en promedio se necesitarían analizar más de 50 SNVs para tener un resultado confiable.

FIGURA 2. REPRESENTACIÓN ESTRUCTURAL DE MARCADORES GENÉTICO-MOLECULARES



En la figura 2 puede observarse la secuencia de DNA de tres individuos en los que se identifican tres variantes genéticas: SNV, INDEL y STR. Dichos cambios representan cambios de un solo nucleótido (SNV), inserciones o deleciones (INDELs) y repeticiones cortas en tándem (STR).

Marcadores mitocondriales

El DNA mitocondrial (mtDNA) ha sido empleado para la identificación humana debido a su alta tasa de variabilidad y a su herencia exclusiva por vía materna. El mtDNA presenta ciertas ventajas sobre el DNA nuclear, por ejemplo, no es necesario aislar las mitocondrias del DNA nuclear para analizar el material genético, mismo que puede extraerse de cabello sin raíz, dientes y huesos altamente degradados. Además, una célula posee un gran número de copias del genoma mitocondrial.

Para poder analizar el mtDNA, se hace una extracción de DNA, seguida de una amplificación por PCR y posteriormente secuenciación. Las secuencias obtenidas son comparadas con una secuencia de referencia, cada variación de un solo nucleótido en la secuencia analizada debe ser reportada y el conjunto de estas variaciones determinan un haplotipo mitocondrial. En cada haplotipo se indica la posición y el tipo de variación respecto a la secuencia de referencia. Además de identificar el haplotipo mitocondrial, se pueden localizar ciertas posiciones, cuyos cambios son más frecuentes en algunas poblaciones y son denominadas como haplogrupos.

La identificación de personas a través del análisis de mtDNA se realiza comparando los haplotipos obtenidos de la muestra de referencia y la muestra problema. Con esta comparación existen tres escenarios posibles: 1) que el resultado sea excluyente, es decir, que ambos haplotipos no coincidan; 2) el resultado sea no concluyente, debido a que la calidad de la secuencia problema no sea adecuada; y 3) que los dos haplotipos coincidan, aunque esto no indica que el individuo al que pertenece la muestra problema está relacionado biológicamente con quien proporcionó la muestra de referencia, sino que ambas personas comparten el mismo linaje mitocondrial. Al igual que con otros marcadores de uso forense, se requiere hacer un análisis estadístico que nos indique cuantas veces es más probable que esa muestra problema esté relacionada biológicamente con la muestra de referencia, respecto con otro individuo al azar en la población. Es importante mencionar que los cálculos de probabilidad del mtDNA requieren de una base de datos poblacionales robustas (> 1000 individuos), debido a que dichos cálculos dependen directamente del número de individuos incluidos en las bases de datos.

Estimación e interpretación estadística

Casos criminales

El procedimiento general para interpretar casos criminales consiste en la comparación de dos o más perfiles genéticos, un perfil correspondiente a un desconocido que cometió o participó en un crimen y que dejó algún tipo de evidencia

biológica en el lugar de los hechos, mientras que el otro perfil debe pertenecer a un individuo en calidad de sospechoso de cometer el crimen. Si los perfiles de DNA no coinciden, se puede decir categóricamente que el sospechoso no es la fuente de la evidencia. En estos casos, tomando en cuenta la evidencia genética y no genética, el juez puede exonerar al detenido de su implicación en el crimen. Por otra parte, si los perfiles coinciden, comienza un proceso de análisis e interpretación para conocer la probabilidad de encontrar el perfil del sospechoso en la población donde sucedió el crimen, con lo que se puede estimar la probabilidad de involucrar a un inocente en el crimen.

Para estas interpretaciones es necesario conocer algunos parámetros forenses y poblacionales (por ejemplo, frecuencias alélicas, equilibrio de Hardy-Weinberg [EHW] y desequilibrio de ligamiento [DL]), que generalmente están disponibles en la literatura científica. El siguiente paso consiste en estimar la frecuencia de los genotipos para cada STR del perfil de DNA, empleando las frecuencias alélicas reportadas en la literatura para esa población. Saber que una población se encuentra en EHW, permite aplicar las siguientes fórmulas para estimar la frecuencia de genotipos: homocigotos = p^2 o q^2 y heterocigotos = $2pq$; donde p y q representan las frecuencias de los alelos en el genotipo. Posteriormente, se multiplican las frecuencias genotípicas estimadas, donde el resultado representa la frecuencia del perfil de DNA. Este último paso solo se debe realizar si se reportó previamente que los marcadores de esa población no presentan asociación entre sí o DL.

La frecuencia del perfil en la población corresponde a la probabilidad de coincidencia al azar (PCA), es decir, la probabilidad de que ese perfil de DNA esté presente en otra persona por el azar. Por último, al inverso del PCA se le conoce como razón de verosimilitud (*likelihood ratio*) y se calcula de la siguiente manera: $LR = 1/PCA$. El LR es un valor cuantitativo que representa el peso de la evidenciagenética, por lo tanto, mientras más grande es el LR, más potente es la evidencia genética para relacionar al sospechoso y la evidencia con el crimen. El último paso consiste en la integración de la evidencia no genética (testigos, videos, audios, antecedentes de amenazas o agresiones, etc.), que deben integrarse para que el juez de un veredicto final. Para este fin se aplica el teorema de Bayes, en el cual se emplean razones de probabilidades (*odds*) que indican cuántas veces es más probable una hipótesis que otra. El propósito del teorema

es obtener un *odds a posteriori* (final), que integre el *odds* genético (*LR*) al *odds a priori* (inicial) asignado por el juez y que surge de la información no genética, simplemente multiplicándolos, es decir: *odds a posteriori* = *odds genético (LR)* x *odds a priori* (información no genética).

Relaciones de parentesco con STRs autosómicos

Los casos de relaciones genéticas más comunes corresponden a los que involucran al hijo —o hijos— en disputa y al supuesto padre, comúnmente conocidos como casos de paternidad dúo. También existen los casos de paternidad trío, que involucran al supuesto padre, a la madre y al hijo(s) en disputa; así como los casos donde se analizan hermanos (hermandad); casos donde se compara al hijo en disputa con la madre y los posibles abuelos paternos, cuando no se cuenta con la muestra biológica del supuesto padre (abuelidad), entre otros casos que se presentan con menor frecuencia. Después de realizar el trabajo de laboratorio y obtener los perfiles genéticos para determinar la paternidad entre un supuesto padre (SP) y un hijo en disputa (H), existen los dos siguientes escenarios posibles al comparar sus perfiles: 1) que en dos o más marcadores no existan coincidencias entre los alelos del SP y H, lo que se denomina como “exclusión” y se descarta inmediatamente la paternidad biológica; y 2) que sí coincida el SP y el H en uno de los dos alelos para cada uno de los marcadores analizados, lo que se puede interpretar como que el SP es el padre biológico del hijo en disputa. Para llegar a esta conclusión se debe realizar una valoración estadística para conocer cuál es la probabilidad de que el perfil de DNA de cualquier persona que no sea el padre biológico coincida por azar o casualidad con el perfil de DNA del hijo en disputa; esto requiere conocer las frecuencias en la población de los alelos que concuerdan entre el SP e H.

En el caso del segundo escenario, para la interpretación estadística se estima un *odds* genético llamado índice de paternidad (IP), el cual es una razón de verosimilitud que compara la hipótesis de que el supuesto padre es el padre biológico (X), respecto a la hipótesis de que el padre biológico es otro individuo de esa población (Y). En ese sentido, la estimación sería de la siguiente manera: $IP = X/Y$, donde Y es el valor de la frecuencia alélica en esa población, que representa la probabilidad de que cualquier otro individuo haya heredado el alelo;

por su parte, X constituye la probabilidad de heredar el alelo paterno por el SP y, en los casos dúo, varía entre 1, 0.5 y 0.25, según la configuración genotípica. Por ejemplo: cuando el SP es homocigoto para el alelo obligado o presenta el mismo genotipo homocigoto que el H el valor de $X = 1$. X es 1 debido a que la probabilidad de transmitir el (los) alelo(s) se basa en $2/2 = 1$. Por otro lado, cuando el SP es heterocigoto y el H es homocigoto o viceversa (SP homocigoto y el H es heterocigoto), el valor es $X = 0.5$. Esto se debe al hecho de que la probabilidad de transmitir el alelo obligado del genotipo paterno al hijo en disputa es $1/2 = 0.5$. En las situaciones donde tanto el SP como el H son heterocigotos, pero solamente comparten un alelo en común, entonces el valor de $X = 0.25$, debido a que de los cuatro alelos existentes SP solo pudo haber aportado uno. Por último, en el supuesto de que SP y H compartan el mismo genotipo heterocigoto, se suele calcular con una fórmula que considera los alelos de ambos de la siguiente manera: $IP = (A+B) / 4 (A \times B)$, donde A y B representan la frecuencia de cada uno de los alelos presentes en los genotipos. En el análisis de los casos trío, el cálculo del IP dependerá de la combinación de los genotipos de los padres y del hijo en disputa, por lo que existen tablas en la literatura con las fórmulas adecuadas para cada combinación de alelos. Una vez que se obtiene el IP individual de cada marcador, se debe calcular un IP combinado (IPC), que resulta de la multiplicación de todos los IP individuales.

Contrario a los casos criminales, en las pruebas de relaciones de parentesco el *odds a priori* suele ser irrelevante para la paternidad —es decir los antecedentes no genéticos no importan, por ejemplo, saber si el SP y madre vivían juntos o separados—, por lo tanto, en la mayoría de los casos se aplica un *odds a priori* neutro, por lo que no es necesario aplicar el teorema de Bayes para la interpretación. En este sentido, el juez puede tomar directamente el valor reportado por el perito. Cabe mencionar que este hecho facilita convertir el IP en probabilidad de paternidad (W), donde en todos los casos se aplica la misma fórmula: $W = [IP/(IP+1) \times 100]$. Es importante aclarar que la labor del perito o analista en genética forense es reportar los valores estadísticos obtenidos en las pruebas de relaciones de parentesco, es decir, no es adecuado reportar que un hombre implicado en una prueba de paternidad es o no el padre biológico del hijo en disputa, pues esa es tarea del juez y de la corte con base en la evidencia estadística (véase tabla 1).

TABLA 1. RESULTADOS DEL CÁLCULO DE UNA PRUEBA DE PATERNIDAD DÚO (SUPUESTO PADRE E HIJO)

GENOTIPOS							IP	IP
Marcador	SP		H		Frecuencias alélicas de H		13 STRs (CODIS)	15 STRs (identifiler)
D3S1358	16	18	14	16	0.071	0.258	1.937984 5	1.937984 5
D13S317	10	13	11	13	0.223	0.118	4.237288 14	4.237288 14
D16S539	11		11	13	0.258	0.144	-	3.875968 99
D18S51	13	20	13	17	0.114	0.128	4.385964 91	4.385964 91
D2S1338	22	24	22	26	0.067	0.138	-	7.462686 57
CSF1PO	10		10		0.271		0.270999 77	0.270999 77
TH01	9.3		9	9.3	0.131	0.209	0.418000 79	0.418000 79
VWA	16	19	16	18	0.326	0.167	2.994011 98	2.994011 98
D21S11	29	31	31	32.2	0.084	0.142	5.952380 95	5.952380 95
D7S820	11	12	8	11	0.106	0.277	0.553998 21	0.553998 21
D5S818	10	11	11		0.445		1.123595 51	1.123595 51
TPOX	8		8	12	0.537	0.102	1.862197 39	1.862197 39
D8S1179	13	15	10	13	0.107	0.344	1.453488 37	1.453488 37
D19S433	13.2	15	13.2	15.2	0.076	0.086	5.813953 49	5.813953 49
FGA	20	26	23	26	0.130	0.074	6.756756 76	6.756756 76

GENOTIPOS						IP	IP
Marcador	SP		H		Frecuencias alélicas de H	13 STRs (CODIS)	15 STRs (<i>identifiler</i>)
					IPC	4 812.37 197	139 198.541
					W (%)	99.97922 45	99.99928 16
SP: supuesto padre H: hijo en disputa IP: índice de paternidad IPC: índice de paternidad combinado W: probabilidad de paternidad							

En esta tabla se comparan los valores de IP y W obtenidos con los 13 STRs incluidos en el CODIS original y con los 15 STRs del kit *identifiler*. Cuando se analizaron 13 STRs se obtuvo una probabilidad de paternidad menor a la mínima necesaria para considerar una paternidad ($W > 99.99\%$), a pesar de que no hay mutaciones, mientras que 15 marcadores sí fueron suficientes para obtener una probabilidad adecuada.

Predicción de características externamente visibles y edad

El enfoque estándar para generar perfiles forenses de DNA con fines de identificación humana utiliza STRs. Sin embargo, cuando este método no logra identificar a un sospechoso en una escena del crimen o no se encuentra una coincidencia en una base de datos de DNA, deben estar disponibles métodos alternativos, ya que cualquier información que pueda ayudar a identificar la procedencia de una muestra es muy valiosa. El fenotipado forense de DNA utiliza conocimientos de genética para obtener información a través de la predicción de rasgos físicos, ascendencia biogeográfica y estimación de la edad de una persona (véase figura 3).

Referente a la predicción de rasgos físicos, las metodologías utilizadas han mejorado mucho, partiendo desde la predicción única del color de ojos (Sistema IrisPlex) hasta la predicción del color de ojos, del cabello y de la piel (Sistema HIrisPlex-S), logrando predicciones precisas a través de marcadores genéticos que son utilizados para generar datos que pueden ser cargados en una plataforma web

fácil de usar (<https://HIrisPlex.erasmusmc.nl/>) para generar probabilidades de predicción individuales a partir de una mínima cantidad de DNA, lo que refleja su alta sensibilidad, además de que permite trabajar con muestras de DNA degradadas. Esta herramienta complementaria se ha convertido en una de las más potentes para ayudar a disminuir el tiempo de trabajo en diferentes casos forenses.

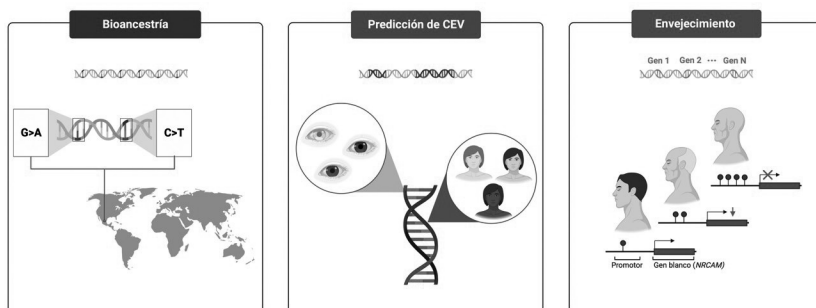
En relación con la edad, algunas clasificaciones involucran análisis morfológicos que aún son esenciales para la investigación de restos humanos. Es necesario puntualizar que solo son aplicables a casos forenses que involucran tejidos sólidos, como huesos y dientes, mientras que los resultados de estas pruebas pueden ser ambiguos. Esta limitación también se aplica a los métodos químicos, como la combinación de racemización con ácido aspártico y análisis de radiocarbono, que proporcionan estimaciones precisas de la edad, pero requieren la presencia de especímenes preferentemente dentales. Diferentes métodos moleculares han sido descritos para tratar de predecir la edad, tales como el análisis del DNA mitocondrial, secuencias teloméricas y métodos epigenéticos, aunque no todas pueden ser aplicadas en el ámbito forense.

El mtDNA fue uno de los primeros marcadores genéticos que se investigaron al respecto, ya que se sabe que su secuencia de nucleótidos cambia en los individuos que envejecen, no obstante, aún hay dificultades técnicas y la asociación de estas con la edad es débil. Por otro lado, se sabe que las secuencias de los telómeros se acortan con cada división celular, pero su aplicación a la estimación de la edad no parece ser sencilla, ya que se han encontrado errores de predicción. El estudio de la metilación del DNA enfocada al área forense para estimar la edad cronológica parece ser la técnica más prometedora, ya que se observa una mayor precisión a través del análisis de cambios en los niveles globales de metilación del DNA, al analizar sitios CpG (citosina por guanina), en el cual el DNA genómico se trata con bisulfito de sodio que desamina la citosina no metilada y se convierte en uracilo, mientras que la citosina metilada no se ve afectada. Con el aumento de la edad, no solo se ha observado la hipometilación del DNA en todo el genoma, sino también la hipermetilación del DNA regional de las islas CpG.

Diferentes marcadores epigenéticos han sido estudiados en relación con la edad, el candidato más prometedor ha sido el gen *NRCAM*, un gen que ha mostrado una correlación de edad más alta en el conjunto de datos de detección a través del análisis de muestras forenses que contienen solo pequeñas cantidades de DNA (<

100 ng). Aunque no ha sido el único marcador asociado, se ha establecido una gran cantidad de datos de patrones de metilación humanos con *Illumina Infinium Human-Methylation450 BeadChip*, a los que a menudo se puede acceder directamente desde bases de datos públicas (<http://agecalculator.ies.krakow.pl/>), que proporcionan un recurso para estudios epigenéticos para desarrollar pruebas predictivas de la edad.

FIGURA 3. APLICACIONES COMPLEMENTARIAS DE MARCADORES GENÉTICO-MOLECULARES EN IDENTIFICACIÓN HUMANA



CEV: características externamente visibles; *NRCAM*: gen que codifica para la molécula de adhesión de células neuronales.

El uso de marcadores complementarios a los STRs permite realizar predicciones de una muestra de DNA sin la necesidad de tener una muestra de referencia y asociarla con una ascendencia biogeográfica, estimar la probabilidad de características externamente visibles, como el color de iris, tez o cabello. Otra aplicación reciente es la predicción de la edad biológica a través del análisis de modificaciones epigenéticas, como la metilación de promotores.

Aplicación de la genética forense: el caso de los Romanov

Un caso famoso resuelto por tecnología de secuenciación en genética forense es el de la familia Romanov, quienes fueron los últimos rusos que ocuparon la monarquía. Tras la abdicación del zar Nicolás II, él, su esposa Alexandra y sus cinco hijos fueron exiliados; según relatos históricos, fueron ejecutados el 17 de julio de

1918. Algunos cuerpos fueron dispuestos en una fosa común, mientras que dos de los niños en fosas separadas. En 1991 la fosa común más grande fue descubierta y aun tras análisis de DNA quedaba la duda si correspondían realmente a la familia Romanov. Más tarde, en 2007, un grupo de arqueólogos descubrieron la segunda tumba y los restos que podrían corresponder a los hijos del zar.

Lo anterior no solo requería asegurar que los restos encontrados pertenecen a la familia de los Romanov, sino también establecer si hay relación directa entre estos restos. Por lo cual se extrajo DNA de los restos y a través de pruebas de mtDNA se pudo determinar que las nuevas muestras encontradas estaban relacionadas con la zarina Alexandra, por lo cual hay un lazo maternal entre estas. Tomando en cuenta que el DNA provino de un fémur y que en la fosa principal se habían encontrado los fémures de la zarina y de sus otros tres hijos, era altamente probable que estos restos encontrados correspondan a sus hijos perdidos.

Por otra parte, se evaluó un panel de STRs autosómicos y el perfil resultante coincide con el árbol genético del zar y la zarina, dado que todos los alelos de las muestras están presentes en él y pueden ser explicados por herencia mendeliana. Finalmente, se determinó un panel de 17 STRs asociados al cromosoma Y (Y-STR) en los restos encontrados en la segunda fosa, comparándolos con los del zar. El resultado mostró una coincidencia (*match*) perfecta, misma que también se encontró en un pariente vivo de los Romanov, el príncipe Andrew Andrevich. Gracias al análisis genético, se pudo confirmar la identidad de estas personas y establecer el parentesco que hay entre estos restos de las diferentes fosas por tres abordajes genéticos complementarios: análisis de mtDNA, STRs autosómicos y del cromosoma Y. Los resultados de estos análisis concuerdan con la hipótesis de que las muestras recuperadas corresponden a los hijos desaparecidos del zar Nicolás II y la zarina Alexandra.

Conclusiones

La genética forense ha revolucionado la identificación humana, ofreciendo herramientas precisas y fiables en situaciones complejas, como desastres, migraciones o conflictos armados. La diversidad de marcadores moleculares, desde huellas dactilares hasta el análisis del DNA ha ofrecido una mayor sensibilidad

y precisión en la identificación, permitiendo así un avance significativo en la resolución de casos. Además, la aplicación de técnicas complementarias, como el análisis del DNA mitocondrial, SNVs e INDELs ha sido fundamental en casos donde el ADN presenta muy baja concentración o está degradado, permitiendo la identificación incluso a partir de muestras antiguas o fragmentadas. En años recientes, el fenotipado forense de DNA ha surgido como una herramienta prometedora para predecir rasgos físicos, ascendencia biogeográfica y edad, ampliando aún más las posibilidades de identificación.

Referencias

- Breslin, K., Wills, B., Ralf, A., Ventayol Garcia, M., Kukla-Bartoszek, M., Pospiech, E., Freire-Aradas, A., Xavier, C., Ingold, S., De la Puente, M., van der Gaag, K. J., Herrick, N., Haas, C., Parson, W., Phillips, C., Sijen, T., Branicki, W., Walsh, S. y Kayser, M. (2019). HIrisPlex-S system for eye, hair, and skin color prediction from DNA: Massively parallel sequencing solutions for two common forensically used platforms. *Forensic Science International: Genetics*, 43, 102152. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102152>
- Buckleton, J. S., Krawczak, M. y Weir, B. S. (2011). The interpretation of lineage markers in forensic DNA testing. *Forensic Science International: Genetics*, 5(2), 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.01.010>
- Butler, J. (2012). *Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology* (1a ed.). Academic Press.
- Coble, M. D., Loreille, O. M., Wadhams, M. J., Edson, S. M., Maynard, K., Meyer, C. E., Niederstätter, H., Berger, C., Berger, B., Falsetti, A. B., Gill, P., Parson, W. y Finelli, L. N. (2009). Mystery solved: The identification of the two missing Romanov children using DNA analysis. *PLoS ONE*, 4(3), e4838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004838>
- Dash, H. R., Shrivastava, P. y Surajit, D. (2020). *Principles and practices of DNA analysis: A laboratory manual for forensic DNA typing*. Springer Protocols Handbooks. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0274-4>
- Evetts, I. W. y Weir, B. S. (1998). *Interpreting DNA evidence: Statistical genetics for forensic scientists*. Sinauer Associates.
- Gaensslen, R. E. (1989). Isoenzymes. En *Sourcebook of forensic serology, immunology, and biochemistry* (2a ed., pp. 463-477). U.S. National Institute of Justice.

- Gjertson, D. W., Brenner, C. H., Baur, M. P., Carracedo, A., Guidet, F., Luque, J. A. *et al.* (2007). ISFG: Recommendations on biostatistics in paternity testing. *Forensic Science International: Genetics*, 1(3-4), 223-231. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.06.001>
- Goodwin, W., Linacre, A. y Hadi, S. (2011). *An introduction to forensic genetics* (2a ed.). Wiley-Blackwell.
- Harbison, C. (2016). ABO blood type identification and forensic science (1900-1960). En *Embryo Project Encyclopedia*. <https://embryo.asu.edu/pages/abo-blood-type-identification-and-forensic-science-1900-1960>
- Jeffreys, A. J. (s. f.). DNA sequence variants in the Gy-, Ay-, δ - and β -globin genes of man. *Science*.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. y Thein, S. L. (1985). Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316(6023), 76-79. <https://doi.org/10.1038/316076a0>
- Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E. y White, R. (1987). Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, 235(4796), 1616-1622. <https://doi.org/10.1126/science.3029864>
- Parson, W., Gusmão, L., Hares, D. R., Irwin, J. A., Mayr, W. R., Morling, N. *et al.* (2014). DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Science International: Genetics*, 13, 134-142. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.07.010>
- Parson, W. (2018). Age estimation with DNA: From forensic DNA fingerprinting to forensic (epi)genomics: A mini-review. *Gerontology*, 64(4), 326-332. <https://doi.org/10.1159/000486239>
- Salado, M., Abboud, D., Baraybar, J. P., Carracedo, A., Fonseca, S., Goodwin, W., Guyomarc'h, P., Jimenez, A., Krenzer, U., Morcillo Mendez, M. D., Prieto, J. L., Rodriguez Gonzalez, J., Ruiz Orozco, Y., Taylor, J., Tennakoon, A., Winter, K. y Finegan, O. (2021). The search process: Integrating the investigation and identification of missing and unidentified persons. *Forensic Science International: Synergy*, 3, 100154. <https://doi.org/10.1016/j.fsisyn.2021.100154>
- Zubakov, D., Liu, F., Kokmeijer, I., Choi, Y., van Meurs, J. B. J., van IJcken, W. F. J., Uitterlinden, A. G., Hofman, A., Broer, L., Van Duijn, C. M., Lewin, J. y Kayser, M. (2016). Human age estimation from blood using mRNA, DNA methylation, DNA rearrangement, and telomere length. *Forensic Science International: Genetics*, 24, 33-43. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.05.014>

Diagnóstico genómico pre- y postimplantación embrionaria

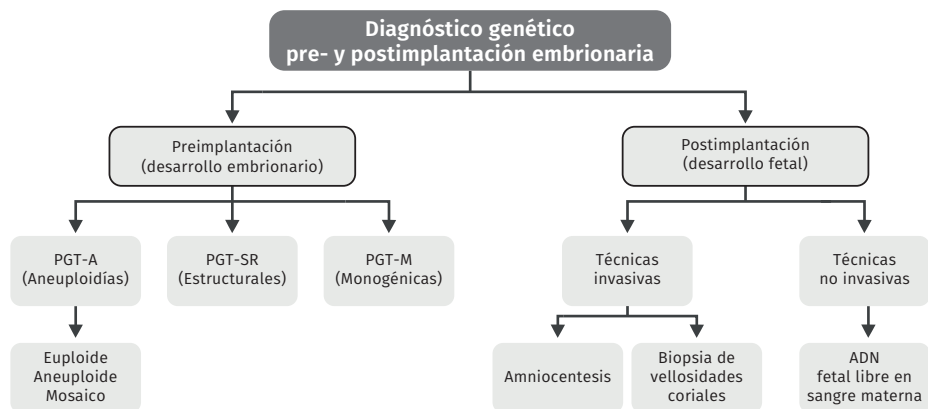
Alejandro Arellano Pérez

Introducción

El diagnóstico genético pre- y postimplantación embrionaria puede realizarse en dos momentos distintos del desarrollo humano previos al nacimiento: el estado embrionario o el estado fetal. Su objetivo es identificar alteraciones cromosómicas, estructurales o monogénicas, lo cual es fundamental para la toma de decisiones en áreas como embriología, genética, biología molecular, medicina reproductiva, medicina materno-fetal, entre otras. Las técnicas empleadas dependen del momento del desarrollo del embrión (preimplantación) o del feto (postimplantación).

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP, también conocido como PGT por sus siglas en inglés) incluye a un subgrupo de técnicas como PGT-A (*preimplantation genetic testing for anueploidy*), PGT-SR (*preimplantation genetic testing for structural rearrangements*) y PGT-M (*preimplantation genetic testing for monogenic diseases*), las cuales requieren el estado embrionario en el día 3 o 5 de desarrollo, y mediante una biopsia de blastómero o trofoectodermo se obtiene material genético para su procesamiento y diagnóstico. Por su parte, el diagnóstico genético postimplantacional o prenatal se realiza en un feto con más de 8 semanas de gestación, y puede llevarse a cabo mediante técnicas invasivas, como el cariotipo obtenido por amniocentesis, o técnicas no invasivas, como el análisis de ADN fetal libre en sangre materna.

FIGURA 1. DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRE- Y POSTIMPLANTACIÓN EMBRIONARIA



Diagnóstico genético preimplantacional

El diagnóstico genético preimplantacional (PGT, *preimplantation genetic testing*), anteriormente conocido como PGD (*preimplantation genetic diagnosis*) o PGS (*preimplantation Genetic screening*), comprende a un conjunto de técnicas realizadas antes de la transferencia e implantación embrionaria en la decidua materna, es decir, antes del embarazo. Su objetivo es seleccionar embriones sin alteraciones cromosómicas o genéticas para ser transferidos a la cavidad uterina, aumentando de esta manera la tasa de implantación de embriones sanos.

Este procedimiento surgió a principios de la década de 1990 como una técnica experimental para identificar enfermedades cromosómicas ligadas al X. Representó un avance significativo con respecto al diagnóstico prenatal (postimplantación), ya que permitió, mediante técnicas como PCR (*polymerase chain reaction*) o FISH (*fluorescence in situ hybridization*), la selección del embrión más apto, incrementando las posibilidades de embarazo y reduciendo la transmisión de enfermedades genéticas hereditarias. Inicialmente, estas técnicas se centraron en el análisis de un número limitado de cromosomas embrionarios. Sin embargo, en la actualidad, se han ampliado para permitir el cribado cromosómico completo (CCS, *comprehensive chromosome screening*) y la amplificación del genoma completo (WGA, *whole-genome amplification*).

Generalmente, el PGT se lleva a cabo en el contexto de tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad, como la fertilización *in vitro* (IVF, *in vitro fertilization*) o la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, *intracytoplasmic sperm injection*). El PGT se divide en tres categorías principales según sus capacidades diagnósticas: PGT-A (análisis de aneuploidías), PGT-SR (anomalías estructurales) y PGT-M (alteraciones monogénicas). Las indicaciones de cada uno de estos procedimientos han evolucionado significativamente desde su introducción, ampliándose conforme avanza la tecnología y se adquiere mayor experiencia en el campo.

Consideraciones embrionarias en el diagnóstico genético preimplantacional

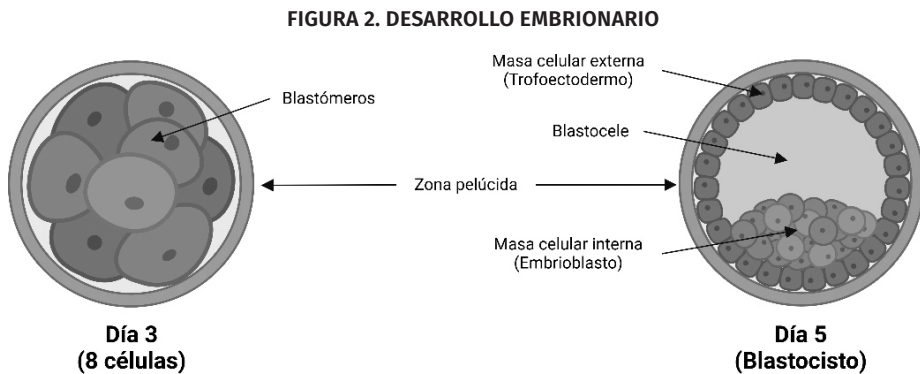
Para llevar a cabo el diagnóstico genético preimplantacional, es necesario obtener ADN del núcleo de una célula embrionaria antes de su implantación. Este material genético puede obtenerse en dos momentos distintos del desarrollo embrionario: mediante biopsia aspiración de un blastómero de embrión con tres días de desarrollo, o mediante biopsia aspiración de trofoectodermo en un blastocisto con cinco o seis días de desarrollo.

Inicialmente, la técnica se realizaba utilizando PCR o FISH en embriones de día tres de desarrollo. Sin embargo, la información genética obtenida en esta etapa es limitada y no ofrece un beneficio clínico significativo.

Los embriones en el tercer día de desarrollo cuentan con aproximadamente ocho blastómeras, de las cuales se extrae solo una para su análisis. En contraste, los embriones en el quinto o sexto día (blastocisto) tienen una estructura celular más compleja, con una masa celular interna (que desarrollará al embrión) y una masa celular externa (que desarrollará a la placenta) más numerosas, permitiendo obtener hasta diez células para su estudio. Esta diferencia, al incluir únicamente la muestra proveniente de una sola célula embrionaria, implica que los embriones de día tres proporcionen una cantidad limitada o poco diversa de ADN para su análisis, lo que dificulta no solo el diagnóstico, sino también la identificación de mosaicismo, frecuente en etapas tempranas del desarrollo embrionario y menos probable en etapas

más avanzadas debido a mecanismos de autocorrección y selección natural. Además, los embriones de día tres presentan una menor tasa de implantación y viabilidad cuando se les somete a biopsia, lo que limita el éxito del tratamiento de reproducción asistida.

El principal inconveniente de analizar blastocistos (embriones de cinco o seis días) es el tiempo necesario para obtener los resultados, lo que implica la vitrificación y transferencia diferida de los embriones biopsiados, aumentando de esta manera el costo del tratamiento de reproducción asistida. A pesar de ello, se prefiere realizar la biopsia en este estadije, ya que en ese momento del desarrollo embrionario se dispone de una mayor cantidad y calidad de material genético, con escasa repercusión negativa para el embrión y mejorando los resultados clínicos.



Introducción a las tecnologías en el diagnóstico genético preimplantacional

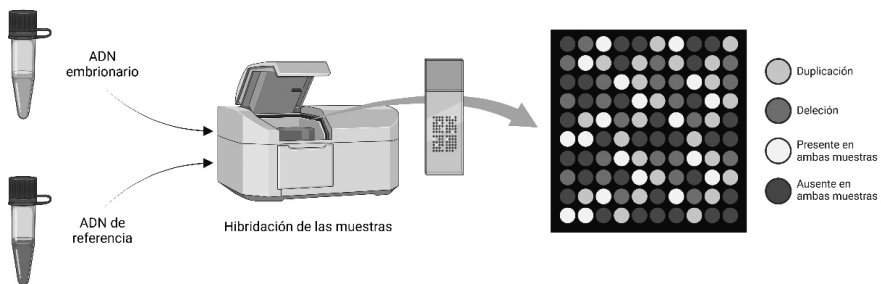
A lo largo de los años, se han desarrollado y perfeccionado variadas técnicas para la evaluación e identificación tanto de anomalías genéticas como cromosómicas en los embriones, superando las limitaciones originales de PCR y FISH. Entre las plataformas más destacadas se encuentran la hibridación genómica comparativa basada en arrays (aCGH, *array-based comparative genomic hybridization*),

los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, *single nucleotide polymorphisms*), la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR, *quantitative polymerase chain reaction*) y la secuenciación de nueva generación (NGS, *next-generation sequencing*). Estas técnicas ofrecen distintos niveles de resolución y precisión, cada una con sus propias ventajas y limitaciones. Sin embargo, en la actualidad, la técnica más novedosa y prometedora en la amplificación del genoma completo del embrión, lo tiene la secuenciación masiva (NGS).

Hibridación genómica comparativa basada en arrays (aCGH)

Esta técnica permite detectar variaciones en el número de copias de ADN entre un embrión y una muestra de referencia. Ambas muestras son marcadas con diferentes fluoróforos, por ejemplo, verde para el ADN del embrión y rojo para el ADN de referencia; y posteriormente hibridizadas en un microarray de oligonucleótidos que contiene las sondas específicas. La intensidad de la fluorescencia resultante indica ganancias o pérdidas de ADN en regiones específicas del genoma, por ejemplo, una mayor fluorescencia verde indica una duplicación en el ADN embrionario, mientras que una mayor fluorescencia roja revela una deleción. Es utilizada para identificar aneuploidías, desequilibrios estructurales y mosaicos cromosómicos. Ofrece una alta resolución y es relativamente rápida, permitiendo la transferencia embrionaria en el mismo ciclo de FIV (fertilización *in vitro*). Sin embargo, la sensibilidad de aCGH en la detección de mosaicos es menor comparada con NGS, y su resolución puede ser insuficiente en anomalías estructurales pequeñas, no pudiendo detectar mutaciones puntuales ni pequeñas inserciones o deleciones.

FIGURA 3. HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA BASADA EN ARRAYS (aCGH)



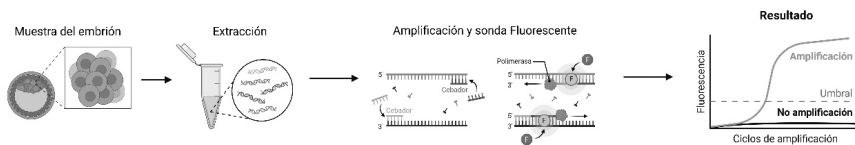
Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) son variaciones en una única base nitrogenada del ADN. Esta técnica se realiza mediante la amplificación de regiones específicas del ADN embrionario que contienen los SNPs de interés. Posteriormente, el ADN se hibrida en un array que contiene sondas específicas para millones de SNPs. La comparación con una muestra de referencia permite identificar variaciones en las posiciones nucleotídicas, lo que confiere a esta técnica una alta resolución y la capacidad de detectar tanto enfermedades monogénicas como polimorfismos. Su principal limitación radica en que no proporciona una visión completa del genoma y requiere el conocimiento previo de los SNPs de interés, lo que eleva el costo y la complejidad del procedimiento.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

La qPCR es una técnica de amplificación y cuantificación de ADN en tiempo real que permite la identificación de secuencias en regiones específicas del ADN embrionario. Este procedimiento se realiza mediante la extracción, purificación y amplificación de las regiones de interés utilizando cebadores específicos. La cuantificación se realiza en tiempo real mediante sondas fluorescentes, lo que permite correlacionar la fluorescencia con la cantidad de ADN presente en la muestra. Es una técnica rápida y precisa, pero con la limitación de no proporcionar información global del genoma embrionario, lo que impide la detección de mosaicismos y desequilibrios cromosómicos.

FIGURA 4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (QPCR)



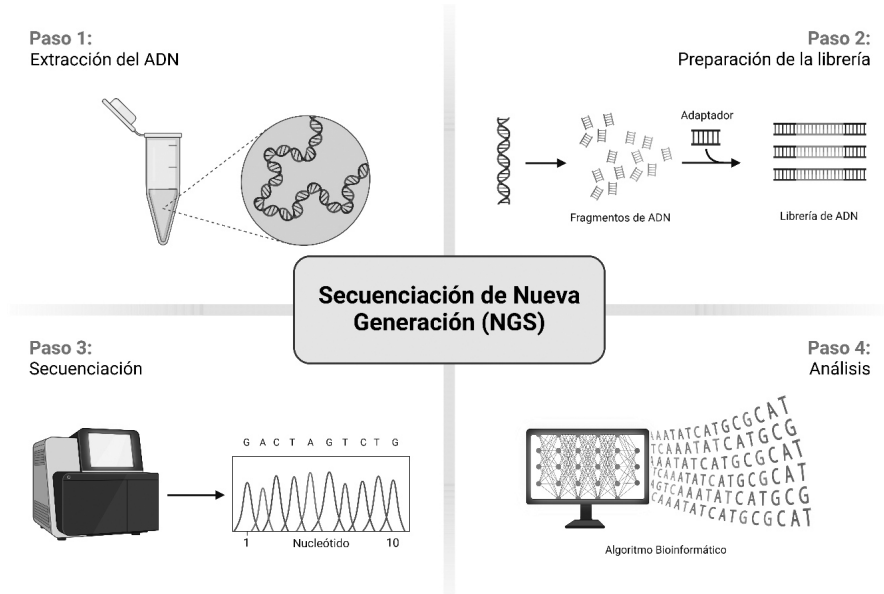
Secuenciación de nueva generación (NGS)

La NGS (*next-generation sequencing*) es una tecnología avanzada de secuenciación masiva que permite un análisis exhaustivo y en paralelo del genoma embrionario, con alta precisión y amplia cobertura. Esta capacidad de realizar una amplificación del genoma completo la convierte en la plataforma tecnológica actual más prometedora en el diagnóstico genético preimplantacional.

El proceso comienza con la extracción y fragmentación del ADN embrionario. A los fragmentos de ADN se les añaden adaptadores específicos en los extremos, dichos fragmentos a menudo se amplifican mediante PCR y, posteriormente, se secuencian simultáneamente. Durante la secuenciación, cada base incorporada en los fragmentos es identificada por el secuenciador, produciendo grandes cantidades de datos en forma de “lecturas” de ADN. Estos datos se analizan con herramientas de bioinformática, permitiendo la identificación de mutaciones puntuales, inserciones, deleciones y variaciones en el número de copias. Es importante señalar que, aunque este es el proceso general de la prueba, pueden encontrarse variaciones de la misma, de acuerdo con la plataforma comercial seleccionada para su procesamiento y análisis.

La implementación de NGS permite la detección de aneuploidías, mosaicismos, alteraciones monogénicas, duplicaciones o deleciones de segmentos de ADN, y puede secuenciar tanto el exoma como el genoma completo. Esto proporciona una visión completa del perfil genético del embrión.

FIGURA 5. SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (NGS)



Técnicas de diagnóstico genético preimplantacional

PGT-A

La técnica de diagnóstico genético preimplantacional de aneuploidías o PGT-A (anteriormente conocida como PGS, *preimplantation genetic screening*), es un método utilizado para identificar alteraciones cromosómicas numéricas en embriones antes de su implantación, generalmente en el contexto de un ciclo de FIV. El objetivo es detectar enfermedades cromosómicas que pueden llevar a fallos de implantación, abortos espontáneos o la presencia de síndromes genéticos.

El proceso de PGT-A, al igual que otras técnicas de diagnóstico genético preimplantacional, comienza con la estimulación ovárica controlada de la paciente, seguida de la recuperación y fertilización de sus ovocitos. Los embriones obtenidos después de la fertilización se mantienen en cultivo hasta alcanzar el día 5 o 6 de desarrollo (fase de blastocisto). A los embriones que han alcanzado este estadio se les realiza una biopsia por aspiración de la capa celular externa

(trofoectodermo) para obtener, en promedio, entre 3 y 8 células. La muestra obtenida se somete a una amplificación del genoma completo y luego se utilizan tecnologías diagnósticas avanzadas, como aCGH (hibridación genómica comparada con microarreglos) o NGS (secuenciación de nueva generación) para evaluar la presencia de aneuploidías en los 24 cromosomas (22 autosomas y los cromosomas sexuales X y Y). Los embriones euploides, aquellos sin anomalías cromosómicas, son seleccionados para su transferencia.

El PGT-A está indicado principalmente para pacientes que presentan un riesgo mayor de aneuploidía por diversos factores clínicos, como edad materna avanzada, falla de implantación recurrente, factor masculino severo y pérdida gestacional recurrente.

A pesar de las ventajas del procedimiento, existen varias limitaciones que deben de ser consideradas rigurosamente, como la imposibilidad, en algunos casos, de detección de mosaicismo cromosómico, lo que puede llevar a falsos positivos o negativos en el diagnóstico. Las técnicas como NGS y aCGH presentan limitaciones en la detección de aneuploidías de bajo nivel o reordenamientos cromosómicos menores, lo que afecta la certeza diagnóstica y la selección adecuada de los embriones. La disponibilidad y acceso a tecnologías avanzadas, como es el caso de NGS, no se encuentran de forma generalizada en los laboratorios del país, lo que limita su implementación.

Los resultados obtenidos a través del PGT-A pueden clasificarse en tres categorías principales: embriones euploides, aneuploides y mosaicos. Estos últimos de particular interés, y pueden ser subclasificados como mosaico de alto grado, bajo grado o indeterminado, aunque actualmente no existe un consenso claro sobre el umbral exacto para esta subdivisión.

Limitaciones del PGT-A en los embriones mosaico

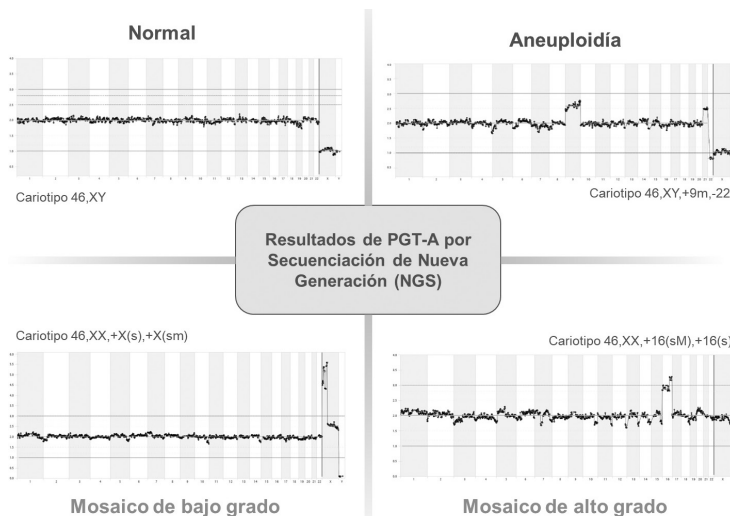
El mosaicismo puede ser definido como la presencia de dos o más líneas celulares con distinta composición cromosómica dentro de un mismo individuo y representa un reto importante para el diagnóstico genético preimplantacional de aneuploidías. La identificación de un número discordante de cromosomas, indicativo de mosaicismo embrionario, puede originarse por varios factores como: variaciones

estadísticas, ruido de la prueba, sesgo de amplificación, contaminación de la muestra, estado mitótico de las células de trofoectodermo, fallo en la técnica de biopsia embrionaria o las condiciones del laboratorio de embriología.

Las técnicas avanzadas, en especial la secuenciación de nueva generación (NGS) ha permitido la detección y cuantificación, cada vez mejor, del mosaicismo en las muestras provenientes de biopsias de trofoectodermo. Sin embargo, estos resultados continúan siendo un reto en su interpretación. Aún no se comprende completamente en qué medida una biopsia de trofoectodermo (encargado del desarrollo placentario) con mosaicismo refleja la verdadera composición de la masa celular interna (a la que se atribuye el desarrollo del feto) y tiene la capacidad de predicción de un desenlace clínico. Lo anterior genera incertidumbre sobre el estado de salud del embrión y los riesgos ante una eventual transferencia.

La evidencia referente a los resultados de transferencias de embriones clasificados como mosaicos, en especial de bajo grado, es cada vez mayor y prometedora, reportando nacimientos vivos sin fenotipos aparentemente anormales. Sin embargo, estos datos deben de ser interpretados con cautela, debido a que pueden identificarse menores tasas de implantación y mayor tasa de aborto espontáneo comparado con los embriones reportados como euploides, siendo necesaria más información que permita mejorar la toma de decisiones.

FIGURA 6. RESULTADOS DE PGT-A POR NGS



PGT-SR

El diagnóstico genético preimplantacional de reordenamientos estructurales (PGT-SR, por sus siglas en inglés) es una técnica avanzada que se enfoca en identificar y seleccionar embriones libres de reordenamientos cromosómicos estructurales, balanceados o no balanceados, que incluyen a las traslocaciones recíprocas o robertsonianas, inserciones, inversiones, deleciones, duplicaciones o anillos.

El proceso para llevar a cabo el PGT-SR implica el desarrollo de varias etapas. Inicialmente se lleva a cabo el proceso de estimulación ovárica controlada, punción y fecundación en laboratorio de los ovocitos obtenidos. Los embriones resultantes se cultivan hasta estadio de blastocisto (día 5 o 6) a los cuales se realiza biopsia de trofoectodermo. Las células obtenidas se someten a análisis genético, que puede incluir FISH, aCGH o preferentemente NGS, permitiendo de esta manera identificar a los embriones con reordenamientos cromosómicos y seleccionar aquellos que son euploides y balanceados para transferencia.

La principal indicación para realizar el procedimiento de PGT-SR es en parejas donde uno o ambos miembros son portadores de translocaciones, inversiones u otros reordenamientos estructurales. La translocación recíproca es la más frecuente, representando más del 60% de los casos, seguida de la translocación robertsoniana con 21% y la inversión en 16%. También se recomienda en individuos con antecedentes familiares de reordenamientos cromosómicos que puedan ser heredados a su descendencia.

A pesar de sus claras ventajas, el PGT-SR presenta algunas limitaciones relacionadas con las tecnologías de detección. Técnicas como FISH, aCGH y NGS tienen restricciones en su resolución, lo que puede impedir la detección de reordenamientos menores a cinco megabases o de regiones subteloméricas. Además, la presencia de mosaicismo puede dificultar la interpretación de los resultados.

Una de las principales diferencias de este procedimiento con respecto al PGT-A, radica en la necesidad de cumplir una serie de prerequisites para que el PGT-SR pueda llevarse a cabo. El principal es la presencia de un reordenamiento en los progenitores o en alguna línea parental con potencial de ser heredado a la descendencia. Una revisión personalizada de los cariotipos parentales permite identificar las reorganizaciones cromosómicas específicas

que deben ser detectadas durante el PGT-SR. En contraste, en el PGT-A son los factores de riesgo los que sugieren la realización del procedimiento, sin necesidad de un diagnóstico específico. En resumen, el PGT-SR se lleva a cabo ante un diagnóstico y patrón de herencia claramente identificados, mientras que el PGT-A puede realizarse solo con la presencia de factores de riesgo o como método preventivo.

PGT-M

El diagnóstico genético preimplantacional de alteraciones monogénicas, o PGT-M por sus siglas en inglés, tiene como objetivo detectar y seleccionar embriones libres de enfermedad genética causada por la mutación puntual en un gen.

Al igual que los procedimientos de diagnóstico preimplantacional previamente descritos, el PGT-M requiere un proceso de estimulación ovárica controlada, recuperación y fertilización de los ovocitos capturados, cultivo de embriones hasta el estadio de blastocisto (día 5 o 6) y posterior biopsia de la masa celular externa (trofoectodermo) para obtener una muestra de material genético. Estas células se procesan a través de técnicas moleculares, como la PCR y secuenciación masiva (NGS), lo que permite detectar mutaciones genéticas específicas. Los embriones libres de enfermedades genéticas son seleccionados para su transferencia.

De la misma manera que para la detección de reordenamientos estructurales, el PGT-M requiere una evaluación genética detallada de los miembros de la pareja y, en algunos casos, de sus familiares cercanos, permitiendo establecer la segregación de los alelos de riesgo que se buscan identificar en los embriones. Es imprescindible tener claro el gen y patrón de herencia de la línea parental previo a la realización del procedimiento de PGT-M.

El diagnóstico de enfermedades monogénicas está indicado para parejas con alto riesgo de transmitir estas enfermedades a su descendencia. Lo que incluye a las enfermedades autosómicas dominantes, autosómicas recesivas y ligadas al cromosoma X. También está indicado en casos de cáncer hereditario (por ejemplo, BRCA1 y BRCA2); enfermedades de inicio tardío como la enfermedad de Huntington, distrofia miotónica tipo 1 y neurofibromatosis; enfermedades ligadas al X, como el síndrome del X frágil, distrofia muscular de Duchenne y hemofilia.

Las ventajas del diagnóstico genético preimplantacional son evidentes, sin embargo, también presenta limitaciones. No todos los trastornos genéticos pueden ser diagnosticados debido a su complejidad y variabilidad genética. En algunos casos, los diagnósticos pueden ser incorrectos debido a limitaciones técnicas, como la presencia de mosaicismo embrionario, lo que puede llevar a la transferencia de un embrión genéticamente heterogéneo. Además, puede ocurrir un fallo en la amplificación de uno de los alelos, conocido como desprendimiento alélico (ADO, del inglés *allelic dropout*), debido a una cantidad inicial baja de ADN o a mutaciones en los sitios de unión de los cebadores, lo que resulta en la amplificación de solo uno de los alelos durante el procedimiento de PCR. Adicionalmente, el PGT-M no garantiza un embarazo exitoso ni un recién nacido completamente sano, ya que solo reduce el riesgo de transmisión de la enfermedad específica para la cual se realizó el diagnóstico.

Avances en el diagnóstico genético embrionario

Los avances en el desarrollo tecnológico bioinformático, la alta capacidad de la secuenciación masiva y la introducción de algoritmos de aprendizaje automático están abriendo un campo, hasta hace poco inexplorado, con la introducción del diagnóstico genético preimplantacional para enfermedades poligénicas (PGT-P). Esto representa un avance significativo en la medicina reproductiva, al ofrecer la posibilidad de evaluar el riesgo de enfermedades poligénicas en embriones previo a su implantación. Los resultados de este análisis permiten generar puntuaciones de riesgo poligénico que facilitarían a los profesionales de la salud y los futuros padres la selección de embriones con menor riesgo de enfermedades, tanto comunes como complejas, influenciadas por múltiples variantes genéticas, como el cáncer, enfermedades cardíacas y diabetes.

La implementación de esta técnica enfrenta varias limitaciones y plantea importantes desafíos éticos. Entre sus limitaciones, se encuentra la falta de diversidad poblacional dentro de los biorepositorios y, en algunos casos, la total ausencia de algunas poblaciones o etnias, lo que dificultaría su implementación en la población general. Mas allá de las limitaciones técnicas, parece más importante la discusión de sus repercusiones éticas, entre las que se encuentran la posibilidad de discriminación genética y el

dilema de seleccionar embriones basado en riesgos poligénicos, exacerbando la desigualdad y prejuicios genéticos en la sociedad. Además, esta técnica podría impactar en escenarios posiblemente triviales, como la variación de los costos en la contratación de seguros médicos, de acuerdo con el perfil poligénico de riesgo del contratante.

Diagnóstico genético prenatal (postimplantación)

El diagnóstico genético postimplantación embrionaria, conocido como diagnóstico genético prenatal, incluye tanto a los procedimientos para obtener las muestras fetales como a las técnicas genéticas para su análisis, las cuales se realizan posterior a la implantación embrionaria y antes del parto, es decir, durante el embarazo, con el fin de detectar anomalías genéticas o cromosómicas fetales.

Existen dos enfoques principales para la obtención de muestras fetales en el diagnóstico genético prenatal: invasivo y no invasivo. Los métodos invasivos, como la amniocentesis y la biopsia de vellosidades coriales, se utilizan para obtener muestras directas del feto, de la placenta o material en suspensión en líquido amniótico. Estos procedimientos implican una intervención directa en el entorno fetal y conllevan un riesgo de complicaciones o pérdida del embarazo, lo que ocurre en aproximadamente 1 de cada 250 intervenciones. Por otro lado, los métodos no invasivos se basan en la obtención de material genético fetal en muestras de sangre de la madre. Este enfoque elimina el riesgo de complicaciones asociadas con los procedimientos invasivos, ofreciendo una alternativa más segura, aunque con limitaciones diagnósticas, para la detección de anomalías genéticas fetales.

Sin embargo, los enfoques invasivo y no invasivo únicamente hacen referencia a la técnica utilizada para la obtención de la muestra fetal y no a la técnica de análisis genético empleada para su procesamiento y diagnóstico. Algunos ejemplos de las técnicas de análisis genético incluyen al cariotipo, qPCR, FISH, microarrays y el análisis de ADN fetal libre en sangre materna. Esta técnica no solo se limita para la detección de alteraciones cromosómicas o genéticas, sino también en enfermedades metabólicas fetales.

La elección de la técnica de análisis está supeditada a la anomalía genética fetal que se pretende diagnosticar y puede dividirse en tres grandes grupos: anomalías cromosómicas, que involucran a su número o estructura y pueden ser visibles al cariotipo fetal; alteraciones submicroscópicas, que afectan fragmentos genómicos no visibles en el cariotipo convencional; y las enfermedades monogénicas, solo detectables utilizando técnicas avanzadas de análisis genético.

Métodos invasivos de diagnóstico prenatal

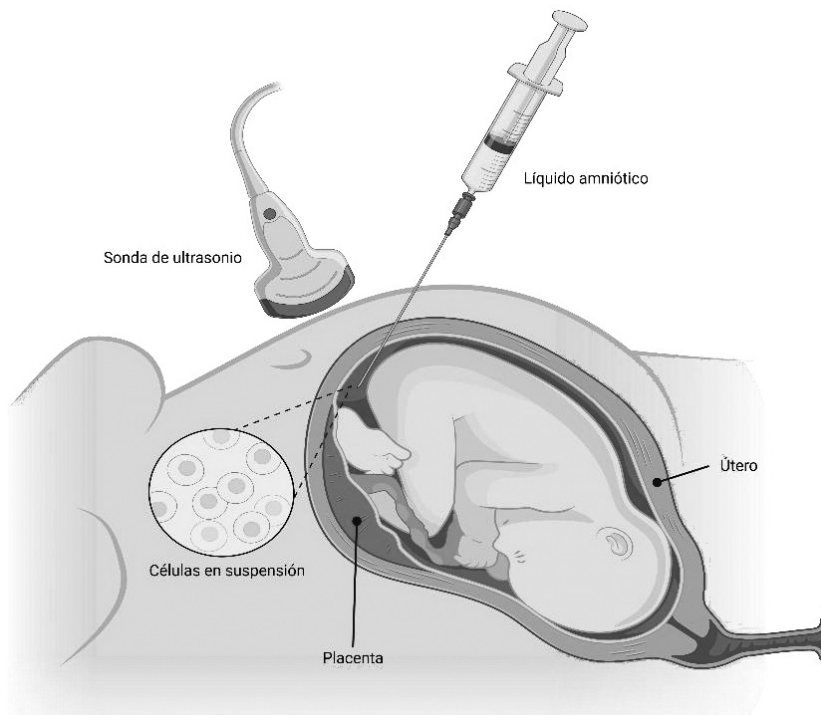
Amniocentesis

La amniocentesis es uno de los procedimientos invasivos más comunes y ha sido una herramienta esencial en el diagnóstico prenatal desde su implementación en la década de 1950. Este procedimiento se lleva a cabo introduciendo una aguja a través del abdomen materno y las membranas amnióticas para obtener una muestra de líquido amniótico bajo la visualización ecográfica. Este líquido contiene células fetales descamativas en suspensión, que se cultivan y analizan mediante diversas técnicas, como el cariotipo, para la detección de anomalías cromosómicas.

La amniocentesis se realiza entre las 15 y 20 semanas de gestación y ofrece una alta precisión diagnóstica, considerándose la prueba confirmatoria posterior a una prueba no invasiva positiva. Sin embargo, no está exenta de complicaciones e implica un riesgo aproximado del 0.5% de eventos obstétricos adversos, incluso en manos de un experto. Entre las complicaciones probables se incluyen hemorragia, rotura prematura de membranas, desprendimiento prematuro de placenta normoinserta, amenaza de parto pretérmino y pérdida fetal.

Además de detectar enfermedades cromosómicas, como el síndrome de Down, la amniocentesis es útil para evaluar enfermedades metabólicas, como la fenilcetonuria, galactosemia y homocistinuria, así como otros trastornos genéticos, como la fibrosis quística, la distrofia muscular de Duchenne y la anemia de Fanconi. Esta prueba es de gran utilidad para el control prenatal, la asesoría de los padres y los cuidados neonatales.

FIGURA 7. AMNIOCENTESIS



Biopsia de vellosidades coriales

La biopsia de vellosidades coriales es otro método invasivo de diagnóstico prenatal. Esta técnica se realiza para obtener tejido placentario, ya sea por medio de la introducción de una pinza para biopsia través del cérvix (transcervical), pasando entre la pared uterina y las membranas amnióticas, o introduciendo una aguja en el abdomen materno (transabdominal), en ambos casos bajo guía ecográfica. La elección de la vía de abordaje está supeditada a la experiencia del profesional que realiza el procedimiento, la disponibilidad de la pinza para la biopsia y la ubicación de la placenta dentro del útero materno. Por ejemplo, posiciones placentarias en la pared posterior del útero permiten la vía transcervical, pero no la transabdominal, debido a la imposibilidad de la aguja para alcanzar a la placenta. A diferencia de la amniocentesis, esta prueba puede realizarse en una etapa más temprana del embarazo, generalmente entre las 10 a 13 semanas de gestación.

La biopsia de vellosidades coriales presenta capacidades diagnósticas similares a la amniocentesis; sin embargo, su realización a una menor edad gestacional ofrece ventajas sustanciales en el manejo y planificación de la gestación. A pesar de sus beneficios, este procedimiento no está exento de riesgos y presenta una mayor probabilidad de pérdida fetal comparada con la amniocentesis.

Métodos no invasivos de diagnóstico prenatal

ADN fetal libre en sangre materna

El descubrimiento y desarrollo del análisis de ADN fetal libre en sangre materna (cffDNA, del inglés *cell-free fetal DNA*) marca un parteaguas en el diagnóstico prenatal, dando origen al diagnóstico prenatal no invasivo (NIPT, del inglés *non-invasive prenatal testing*) y representa una evolución significativa en la medicina fetal.

La posibilidad de detectar cffDNA en la circulación materna fue reportada por primera vez en 1997 por Lo *et al.*, quienes identificaron secuencias específicas del cromosoma Y del ADN fetal en plasma y suero materno de embarazos con fetos masculinos. Sin embargo, ha sido gracias al avance en las plataformas de análisis genético, como PCR y la secuenciación masiva (NGS), que el cffDNA ha mejorado significativamente su precisión y fiabilidad, convirtiéndose en la prueba de tamizaje con mayor tasa de detección para enfermedades cromosómicas, superando a los marcadores bioquímicos y al ultrasonido de primer trimestre, lo que ha permitido su implementación clínica desde etapas tempranas del embarazo.

El cffDNA circulante en sangre materna proviene principalmente de la apoptosis de células del trofoblasto que se desprenden de la placenta, liberando fragmentos de ADN a la circulación de la madre. Estos fragmentos pueden ser detectados a partir de la quinta semana de gestación en el torrente sanguíneo a través de una venopunción, y alcanzan su máxima concentración al final del primer trimestre, manteniéndose con niveles constantes a lo largo del embarazo. El cffDNA tiene una vida media corta, aproximadamente de 16 a 30 minutos, lo que permite que el ADN fetal de embarazos previos no contamine la muestra para su detección en embarazos subsecuentes y asegura que la prueba refleje el estado genético fetal más reciente.

Además de las secuencias específicas del cromosoma Y (SRY), existen otras características que permiten diferenciar el ADN libre fetal del materno. El ADN libre en la sangre materna se encuentra fragmentado, siendo los fragmentos fetales más cortos (con un pico de señal de 143 pares de bases) en comparación con los fragmentos maternos (con un pico de señal de 166 pares de bases), esta diferencia en el tamaño permite separar y analizar el ADN fetal presente en la muestra. Otra característica distintiva en el ADN es su metilación. El gen MASPIN y el promotor del gen RASSF1A se encuentran hipermetilados en la placenta e hipometilados en las células maternas, lo que permite eliminar los fragmentos maternos mediante digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación y, posteriormente, cuantificarlos utilizando qPCR, lo que los convierte en marcadores universales del cffDNA. Estas diferencias en el tamaño y metilación del ADN permiten realizar diagnósticos más certeros e incluir a los embarazos con fetos femeninos.

Un factor importante que considerar para el correcto análisis e interpretación de la prueba es la fracción fetal presente en la muestra sanguínea materna. Esta fracción fetal corresponde a la proporción de cffDNA en comparación con el ADN total que se obtiene de la muestra, la cual suele oscilar entre 3% al 10% durante el primer trimestre, incrementándose ligeramente conforme avanza la gestación. Debido a que esta fracción fetal es esencial para el correcto análisis de la prueba, la mayoría de los laboratorios sugieren que se realice a partir de la décima semana de gestación y con un mínimo de 3.5% de fracción fetal.

Las técnicas genéticas empleadas para el análisis del cffDNA incluyen primordialmente a la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) y la secuenciación de nueva generación (NGS). La primera permite la cuantificación utilizando sondas fluorescentes unidas a la región diana y la segunda, secuenciar millones de fragmentos de ADN de forma simultánea, estos fragmentos son comparados con una muestra de referencia y los datos obtenidos son analizados por algoritmos bioinformáticos, en algunos casos patentados. La combinación permite identificar aneuploidías y otras alteraciones genéticas con mayor precisión. La sensibilidad de la prueba para la detección de aneuploidía fetal, en específico para trisomía 13, 18 y 21 y de alteraciones

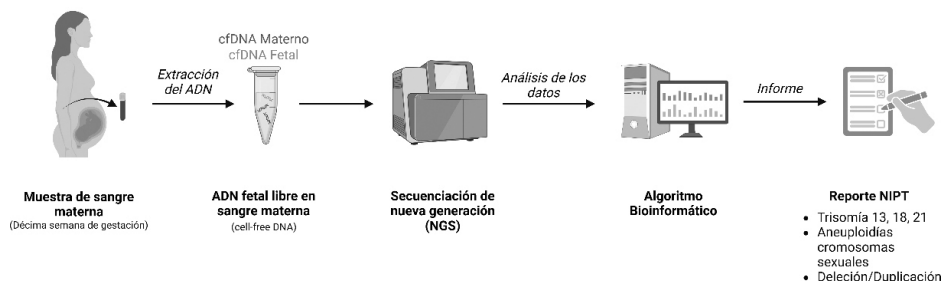
de los cromosomas sexuales, se reporta en 99%. Si bien, la prueba es utilizada para la detección de otras aneuploidías, como trisomía 9, 16 y 22, además de microdeleciones y duplicaciones, la información respecto de su sensibilidad diagnóstica es limitada y generalmente no puede detectar deleciones o duplicaciones menores a cinco megabases.

El cffDNA está indicado como prueba de tamizaje para mujeres embarazadas con riesgo alto de enfermedad cromosómica, ya sea por edad materna avanzada, resultado anormal o no concluyente en el ultrasonido de primer trimestre o marcadores bioquímicos, por antecedentes familiares o en los casos en los que las pruebas diagnósticas invasivas conlleven riesgos adicionales al binomio materno- fetal.

Si bien, el análisis de cffDNA presenta ventajas con respecto a los métodos invasivos, también tiene ciertas limitaciones. Entre las principales, se encuentra la fracción fetal baja en algunas muestras, asociado a un índice de masa corporal materno elevado, generalmente superior a 40 kg/m^2 , lo que conduce a una proporción superior de ADN materno respecto a la fracción fetal. El origen del cffDNA es principalmente del trofoblasto, por lo tanto, la prueba está limitada en casos de mosaicismo placentario, en el que la composición genética del feto y la placenta es distinta; de forma similar, la prueba no puede detectar mosaicismo fetal. Otras limitaciones se pueden presentar respecto al tamaño de la alteración genética, poliploidía, traslocaciones, inversiones y anillos, enfermedades monogénicas o poligénicas. A pesar de su alta capacidad en la detección de aneuploidías, la prueba prenatal no invasiva se considera una prueba de tamizaje, no una prueba diagnóstica; por esta razón, se recomienda que posterior a un resultado de alto riesgo en la prueba no invasiva, se realice un procedimiento diagnóstico confirmatorio a través de un método invasivo prenatal.

La investigación en el campo del diagnóstico no invasivo continúa evolucionando, con el objetivo de desarrollar métodos que permitan incorporar la detección de trastornos monogénicos y microdeleciones, mejorar el aislamiento de las células fetales y la cuantificación de la fracción fetal, además de la identificación de una gama más amplia de condiciones genéticas y otras asociadas a la salud placentaria.

FIGURA 8. DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO (NIPT)



Conclusiones

El diagnóstico genético preimplantacional y prenatal han generado un importante cambio en la medicina reproductiva y fetal, transformando el abordaje de las condiciones genéticas desde las etapas tempranas del desarrollo embrionario hasta el periodo prenatal. Estas tecnologías, que incluyen a las avanzadas técnicas de secuenciación masiva y el análisis del ADN fetal libre en sangre materna, han permitido mejorar la precisión diagnóstica y el tamizaje temprano de diversas alteraciones genéticas y cromosómicas. Gracias a su implementación, se ha logrado aumentar la tasa de éxito en los tratamientos de reproducción asistida, reducir la incidencia de abortos espontáneos y disminuir la transmisión de enfermedades hereditarias; respondiendo a las necesidades y cambios de comportamiento reproductivo y social, en el que el inicio de la maternidad se ha trasladado a edades con mayor riesgo de enfermedad, proporcionando tanto a los profesionales como a los futuros padres la posibilidad de tomar decisiones informadas y planificar a su descendencia. A medida que estos métodos continúen evolucionando, disminuyan sus costos y se integren de forma más común en la práctica clínica, será fundamental discutir los desafíos éticos que plantean e implementar estrategias que permitan su acceso a grupos poblacionales cada vez más amplios.

Referencias

- Borrell, A., Sabrià, J., Bádenas, C., Rodríguez-Revenga, L., Soler, A., Jodar, M. y Oriola, J. (2021). Protocolo: Estudios Genéticos En Muestras Fetales. En *Protocolos en Medicina Materno-Fetal (MMF-15-2007)*. <https://medicinafetalbarcelona.org/protocolos/es/patologia-fetal/EstudiosGeneticosEnMuestrasFetales.pdf>
- Carvalho, F., Coonen, E., Goossens, V., Kokkali, G., Rubio, C., Meijer- Hoogveen, M., Moutou, C., Vermeulen, N. y De Rycke, M. (2020). ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the organisation of PGT. *Human Reproduction Open*, 2020(3), 1-12. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa021>
- Carvalho, F., Moutou, C., Dimitriadou, E., Dreesen, J., Giménez, C., Goossens, V., Kakourou, G., Vermeulen, N., Zuccarello, D. y De Rycke, M. (2020). ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders. *Human Reproduction Open*, 2020(3), 1-18. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa018>
- Chan, K. C. A., Ding, C., Gerovassili, A., Yeung, S. W., Chiu, R. W. K., Leung, T. N., Lau, T. K., Chim, S. S. C., Chung, G. T. Y., Nicolaides, K. H. y Lo, Y. M. D. (2006). Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clinical Chemistry*, 52(12), 2211-2218. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.074997>
- Chen, D., Xu, Y., Ding, C., Wang, Y., Fu, Y., Cai, B., Wang, J., Li, R., Guo, J., Pan, J., Zeng, Y., Zhong, Y., Shen, X. y Zhou, C. (2022). The inconsistency between two major aneuploidy-screening platforms—single-nucleotide polymorphism array and next-generation sequencing—in the detection of embryo mosaicism. *BMC Genomics*, 23(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08294-1>
- Chen, H. F., Chen, M. y Ho, H. N. (2020). An overview of the current and emerging platforms for preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) in in vitro fertilization programs. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 59(4), 489-495. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2020.05.004>
- Coonen, E., Rubio, C., Christopikou, Di., Dimitriadou, E., Gontar, J., Goossens, V., Maurer, M., Spinella, F., Vermeulen, N. y De Rycke, M. (2020). ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of structural and numerical chromosomal aberrations. *Human Reproduction Open*, 2020(3), 1-20. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa017>

- Du, R. Q., Zhao, D. D., Kang, K., Wang, F., Xu, R. X., Chi, C. L., Kong, L. Y. y Liang, B. (2023). A review of pre-implantation genetic testing technologies and applications. *Reproductive and Developmental Medicine*, 7(1), 20-31. <https://doi.org/10.1097/RD9.000000000000049>
- Friedenthal, J., Maxwell, S. M., Munné, S., Kramer, Y., McCulloh, D. H., McCaffrey, C. y Grifo, J. A. (2018). Next generation sequencing for preimplantation genetic screening improves pregnancy outcomes compared with array comparative genomic hybridization in single thawed euploid embryo transfer cycles. *Fertility and Sterility*, 109(4), 627-632. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.12.017>
- Harris, B. S., Bishop, K. C., Kuller, J. A., Alkilany, S. y Price, T. M. (2021). Preimplantation genetic testing: a review of current modalities. *F and S Reviews*, 2(1), 43-56. <https://doi.org/10.1016/j.xfnr.2020.10.001>
- Hromadnikova, I., Zejskova, L., Kotlabova, K., Jancuskova, T. y Doucha, J. (2010). Quantification of Extracellular DNA Using Hypermethylated Evaluation of Diagnostic Possibilities. *DNA and Cell Biology*, 29(6), 295-301.
- Hui, L., Ellis, K., Mayen, D., Pertile, M. D., Reimers, R., Sun, L., Vermeesch, J., Vora, N. L. y Chitty, L. S. (2023). Position statement from the International Society for Prenatal Diagnosis on the use of non-invasive prenatal testing for the detection of fetal chromosomal conditions in singleton pregnancies. *Prenatal Diagnosis*, 43(7), 814-828. <https://doi.org/10.1002/pd.6357>
- Leaver, M. y Wells, D. (2020). Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): The next revolution in reproductive genetics? *Human Reproduction Update*, 26(1), 16-42. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz033>
- Levy, B. (2019). Prenatal Diagnosis. En B. Levy (Ed.), *Humana Press* (2da ed.). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8889-1>
- Lo, Y. M. D., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, W. G. C. y Wainscoat, J. S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet*, 350(9076), 485-487. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)02174-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02174-0)
- Lo, Y. M. D., Tein, M. S. C., Lau, T. K., Haines, C. J., Leung, T. N., Poon, P. M. K., Wainscoat, J. S., Johnson, P. J., Chang, A. M. Z. y Hjelm, N. M. (1998). Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implications for noninvasive prenatal diagnosis. *American Journal of Human Genetics*, 62(4), 768-775. <https://doi.org/10.1086/301800>

- Page-Christiaens, L. y Klein, H. G. (2018). Noninvasive Prenatal Testing (NIPT). En *Universitas Nusantara PGRI Kediri* (Vol. 01). Elsevier Inc.
- Pérez, D. L. B. C. E. (2023). *Tratado de Esterilidad e Infertilidad Humanas*. Editorial Médica Panamericana S.A.
- Practice Committee and Genetic Counseling Professional Group (GCPG) of the American Society for Reproductive Medicine (2020). Clinical management of mosaic results from preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) of blastocysts: a committee opinion. *Fertility and Sterility*, 114(2), 246-254. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.05.014>
- Raymond, Y. C., Acreman, M. L., Bussolaro, S., Mol, B. W., Fernando, S., Menezes, M., Da Silva Costa, F., Fantasia, I. y Rolnik, D. L. (2023). The accuracy of cell-free DNA screening for fetal segmental copy number variants: A systematic review and meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 130(6), 549-559. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.17386>
- Sermon, K. y Viville, S. (2014). Textbook of Human Reproductive Genetics. En *Textbook of Human Reproductive Genetics* (Vol. 9781107683). <https://doi.org/10.1017/CBO9781139236027>
- Sills, S. E. (2015). Screening the Single Euploid Embryo. En S. E. Sills (Ed.), *Screening the Single Euploid Embryo*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16892-0>
- Simón, C. (2017). *Handbook of New Genetic Diagnostic Technologies in Reproductive Medicine*. <https://doi.org/10.1201/9781315119793>
- Treff, N. R., Eccles, J., Lello, L., Bechor, E., Hsu, J., Plunkett, K., Zimmerman, R., Rana, B., Samoilenko, A., Hsu, S. y Tellier, L. C. A. M. (2019). Utility and First Clinical Application of Screening Embryos for Polygenic Disease Risk Reduction. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 1-6. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00845>
- Treff, N. R., Eccles, J., Marin, D., Messick, E., Lello, L., Gerber, J., Xu, J. y Tellier, L. C. A. M. (2020). Preimplantation genetic testing for polygenic disease relative risk reduction: Evaluation of genomic index performance in 11,883 adult sibling pairs. *Genes*, 11(6), 1-11. <https://doi.org/10.3390/genes11060648>
- Yang, Z., Lin, J., Zhang, J., Fong, W. I., Li, P., Zhao, R., Liu, X., Podevin, W., Kuang, Y. y Liu, J. (2015). Randomized comparison of next-generation sequencing and array comparative genomic hybridization for preimplantation genetic screening: A pilot study. *BMC Medical Genomics*, 8(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12920-015-0110-4>

Generación de vacunas de ácidos nucleicos: DNA o RNA

Jorge Hernández Bello

Alejandra Natali Vega Magaña

Introducción

A más de dos siglos de su desarrollo, las vacunas han demostrado una alta eficacia para disminuir e incluso erradicar la morbi-mortalidad causada por enfermedades infecciosas, como la viruela, el tétanos, el sarampión, entre otras.

Para el desarrollo de vacunas existen distintas plataformas, entre las clásicas se listan a las basadas en microorganismos debilitados (vivas atenuadas), en microorganismos muertos (inactivadas), en toxinas bacterianas inactivadas (toxoides) y en antígenos purificados (subunidades). Todas ellas tienen bondades y algunas limitaciones, como sus altos costos, elevado tiempo de producción, alta reactogenicidad, baja inmunogenicidad y poca flexibilidad para modificar su composición antigénica. Por lo anterior, se ha trabajado arduamente para desarrollar vacunas de nueva generación, como las basadas en ácidos nucleicos (DNA O RNA), las cuales se están convirtiendo en una plataforma segura y versátil para combatir enfermedades infecciosas y cánceres. Este capítulo provee una descripción general del fundamento de las vacunas basadas en ácidos nucleicos, sus ventajas, desventajas y aplicaciones actuales.

Ventajas y desventajas de las vacunas basadas en DNA y RNA

Las vacunas basadas en ácidos nucleicos han demostrado grandes ventajas sobre las clásicas; sin embargo, también se observan algunas limitaciones. Entre las ventajas se encuentra la simplicidad para desarrollarse. Esto debido a que utiliza técnicas comunes en biología molecular para la síntesis de oligonucleótidos, lo cual a su vez permite su fabricación a gran escala y puede permitir modificaciones al diseño/ secuencia original, si así se requiriera (por ejemplo, si aparecieran variantes del patógeno original). Otra ventaja evidente es que al contener solo ácido nucleico, este no se puede replicar, transmitir o transformar en una forma patógena o infección secundaria como aquellas basadas en patógenos atenuados. Además, al transportar una secuencia predeterminada permite expresar antígenos locales que inducen respuestas específicas de células T y B, así como la inducción de anticuerpos neutralizantes. Por otra parte, los ensayos clínicos preliminares no han observado reacciones adversas graves o toxicidad a estas vacunas. Otra ventaja se debe a que el DNA es resistente a cambios de temperaturas, por lo tanto, el almacenamiento y transporte es menos complejo. Finalmente, además del gen blanco que porta la secuencia del antígeno al que se requiere generar inmunidad, estas vacunas pueden contener genes que codifican para moduladores de la respuesta inmunitaria como citocinas o correceptores/ligandos de células T y B, los cuales limitan el rechazo a estas vacunas y disminuyen su reactogenicidad.

Por otra parte, una de las principales limitaciones de esta tecnología es que ofrece una respuesta inmunogénica relativamente baja comparada con otras plataformas; esto limita que se produzcan grandes cantidades de anticuerpos neutralizantes, lo que ha atrasado su avance en diferentes etapas de ensayos clínicos al no alcanzar los estándares demandados por las sociedades internacionales de vacunas.

Otra desventaja de las vacunas de DNA es el poco control que se tiene una vez que el DNA entra a las células. Lo anterior dificulta garantizar que todo el contenido de DNA ingrese al núcleo celular, se logren niveles suficientes de transcripción, de maduración, exportación al citoplasma y traducción del mRNA. Por otra parte, pese a las escasas evidencias, aún existe controversia sobre la seguridad

de estas vacunas, entre ellas, se discute sobre el potencial riesgo de inducir la producción de anticuerpos anti-DNA, los cuales podrían asociarse a procesos de autoinmunidad. Así también, se discute su riesgo potencial de integración en el genoma del hospedero, lo que podría originar mutaciones por inserción. Sin embargo, es importante mencionar que actualmente se han desarrollado cambios a esta plataforma basada en DNA que minimizan estos riesgos. La tabla 1 resume las principales ventajas y desventajas de las vacunas basadas en DNA.

TABLA 1. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LAS VACUNAS BASADAS EN DNA

VENTAJAS	DESVENTAJAS/LIMITACIONES
Desarrollo y construcción simple	Inmunogenicidad baja comparada a otras plataformas
Alta seguridad	Dificultad de la entrega del DNA al núcleo celular
Especificidad antigénica similar a las vacunas de subunidades	Condiciones específicas de almacenamiento
Fácil almacenamiento y distribución	Potencial riesgo de desarrollo de anticuerpos anti-DNA
Pueden manipularse para ser menos reactogénicas	Potencial riesgo de integración genómica
Oportunidad de modificación de secuencia	
DNA = ácido desoxirribonucleico	

Respecto a las vacunas basadas en RNA, las ventajas de esta plataforma son muchas, una de las más importantes es que el RNA solo codifica el gen de interés y no requiere de vectores para su entrega, lo que hace más sencillo su desarrollo y su producción a gran escala de manera económica. Además, su mecanismo de acción evita el potencial riesgo de integración al genoma. Algunas vacunas aprobadas contra la covid-19 están basadas en mRNA y han demostrado que la modificación de bases nitrogenadas disminuye la activación de la respuesta inmune innata, la re-actogenicidad y el rechazo, mientras que garantiza una mayor tasa de traducción.

Una de las principales desventajas de esta plataforma es que el RNA es sensible a cambios de temperatura; esto dificulta su almacenamiento y distribución. Por otra parte, dentro de las células, la expresión de antígenos es transitoria debido a la rápida degradación del mRNA. Otra debilidad importante es que las nucleasas intracelulares (RNasas) pueden degradar el RNA. Por otra parte, pese

a que la liberación de este tipo de vacunas generalmente es mediada por nanopartículas lipídicas, el alto peso molecular y la interacción entre las moléculas de mRNA cargadas negativamente puede generar repulsión electrostática, que puede limitar la fusión con la membrana plasmática y su ingreso a las células. Finalmente, debido al reciente desarrollo de esta plataforma, aún existen pocos ensayos con resultados a largo plazo que garanticen su seguridad. La tabla 2 resume sus principales ventajas y desventajas de las vacunas basadas en RNA.

TABLA 2. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LAS VACUNAS BASADAS EN RNA

VENTAJAS	DESVENTAJAS/LIMITACIONES
Desarrollo y construcción simple	Riesgo de degradación mediada por RNasas
Solo codifican gen de interés/no requieren vector de DNA	Dificultad de la entrega del RNA al citoplasma
Alta seguridad/poca reactogenicidad	Escasos estudios a largo plazo
Producción masiva a bajo costo	
Especificidad antigénica similar a las vacunas de subunidades	
Inducción efectiva de anticuerpos neutralizantes a baja dosis	
Oportunidad de modificación de secuencia	
Sin riesgo de integración genómica	
RNA = ácido ribonucleico	

Proceso de fabricación de vacunas de DNA

Las vacunas de DNA implican la inoculación directa *in situ* de vectores o constructos de expresión eucarióticos basados en DNA, que codifican la secuencia de un antígeno proteico patógeno (véase figura 1). Los constructos plasmídicos se cultivan generalmente en bacterias como *Escherichia coli*, para luego ser purificados por métodos cromatográficos con el fin de evitar la contaminación por LPS de la bacteria por sus propiedades inmunotóxicas. Como se mencionó anteriormente, una buena vacuna debe ser rápida, reproducible, de desarrollo

simple, termoestable y fabricada con costos y riesgos de desarrollo reducidos, y las vacunas de DNA cumplen con muchas de estas características. El proceso de manufactura se puede dividir en tres pasos generales:

- ♦ *Upstream*: en este paso se genera el diseño del constructo.
- ♦ *Downstream*: en este paso se producen las vacunas y se purifican para la eliminación de impurezas mejorando la seguridad y estabilidad.
- ♦ *Formulación*: aquí se preparan todos los componentes para una entrega eficiente.

Proceso *upstream*

Para que los genes que codifican los antígenos y adyuvantes genéticos sean transcritos a mRNA y posteriormente exportados hacia el citoplasma para su traducción, es necesario que el material genético de la vacuna de DNA entre de manera eficiente al núcleo, especialmente en las células que ya no realizan la mitosis. Para lograrlo se puede introducir secuencias de unión a factores de transcripción específicos de tejido en plásmidos, o secuencias de DNA de virus que tienen una señal de localización nuclear, que conducen al transporte nuclear activo de DNA. Otra manera de realizarlo es la formación de complejos de proteína-DNA antes de la administración de la vacuna, con proteínas que mejoren la localización nuclear del DNA como NF κ B (p 50) o el represor de tetraciclina NLS diseñado.

Por lo tanto, como primer paso de la producción de vacunas de DNA, es importante diseñar el constructo de DNA donde será insertado el gen del antígeno de interés. Este constructo está compuesto por un origen de replicación bacteriano y al menos un gen de resistencia a antibióticos como marcador seleccionable. Además, deben contener al menos un casete de expresión, el cual está compuesto por un promotor/potenciador eucariótico, el gen del antígeno y una secuencia de la señal poli A, ya que son esenciales para la expresión del antígeno en las células eucariotas.

Para la expresión de múltiples genes en una sola vacuna de DNA, ya sea para la obtención de más de un antígeno o para la expresión de un adyuvante genético que se encuentre combinado con el antígeno, se puede realizar una de estas tres estrategias:

1. Utilizar diferentes casetes de expresión para cada gen con promotores individuales, para que cada gen se exprese individualmente.

2. Utilizar vectores multicistrónicos con un único promotor para la expresión de varios genes, pero que se encuentren separados por elementos del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, del inglés *internal ribosome entry site*) para que sean traducidos individualmente.
3. Usar una secuencia T2A derivada de virus en vez de IRES entre genes, para que una proteasa endógena escinda la secuencia peptídica que reconozca después de la traducción.

Proceso *downstream*

Existen diferentes tipos de constructos de DNA que son producidos por distintos métodos, como son los plásmidos de DNA, DNA en minicírculo, constructos de expresión minimalista cerrados covalentemente con un gen de expresión inmunológicamente definido (MIGDE, por sus siglas en inglés, *immunologically defined gene expression*) o DNA Doggybone™.

Plásmidos de DNA

Es producido por medio de bacterias modificadas genéticamente, como *Escherichia coli*. Estas bacterias son cultivadas en condiciones de fermentación a través de medios de cultivos mínimos con sustancias químicamente definidas como fuente de carbono, sales y vitaminas. Posteriormente, estas células bacterianas son cosechadas por centrifugación o microfiltración, para luego ser lisadas con métodos químicos, físicos o mecánicos. Luego, este lisado es clarificado por medio de microfiltración de flujo cruzado para eliminar los sólidos, seguido de múltiples purificaciones para la eliminación de contaminantes, como proteínas del hospedero, endotoxinas, RNA, DNA genómico, así como DNA plasmídico lineales o circulares abiertas, a través de la precipitación de contaminantes, precipitación de plásmidos y purificación cromatográfica (cromatografía de intercambio de iones, seguido de cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de exclusión por tamaño). Finalmente, el DNA plasmídico ya purificado, se formula con excipientes y adyuvantes; posteriormente, es filtrado con filtros esterilizantes como membranas de polietersulfona y difluoruro de polivinilideno.

DNA en minicírculo

Es producido por la inducción de recombinación intramolecular de un plásmido parental en *E. coli*, a través de un sistema de expresión génica inducible (por ejemplo, por arabinosa) para la expresión de una recombinasa y una enzima de restricción. La recombinasa conduce la recombinación específica del sitio entre sus secuencias de reconocimiento, y en consecuencia se originan dos moléculas de DNA circulares distintas:

- ◇ Un DNA en minicírculo donde se encuentra el casete de expresión eucariota
- ◇ Un mini plásmido (MP) que es el esqueleto bacteriano

El MP es posteriormente degradado de manera específica por la enzima de restricción y el DNA en minicírculo se extrae, se purifica y formula como los plásmidos de DNA.

Vectores MIDGE

Son oligodesoxinucleótidos en horquilla que generan una molécula de DNA en forma de mancuerna cerrada covalentemente. Son producidos al ligar los fragmentos resultantes por la digestión del plásmido de DNA con una enzima de restricción, y los fragmentos que no fueron ligados, así como esqueletos de plásmidos, se digieren por la DNA polimerasa T7. Finalmente, los vectores MIDGE se purifican por cromatografía y se formulan como plásmidos de DNA.

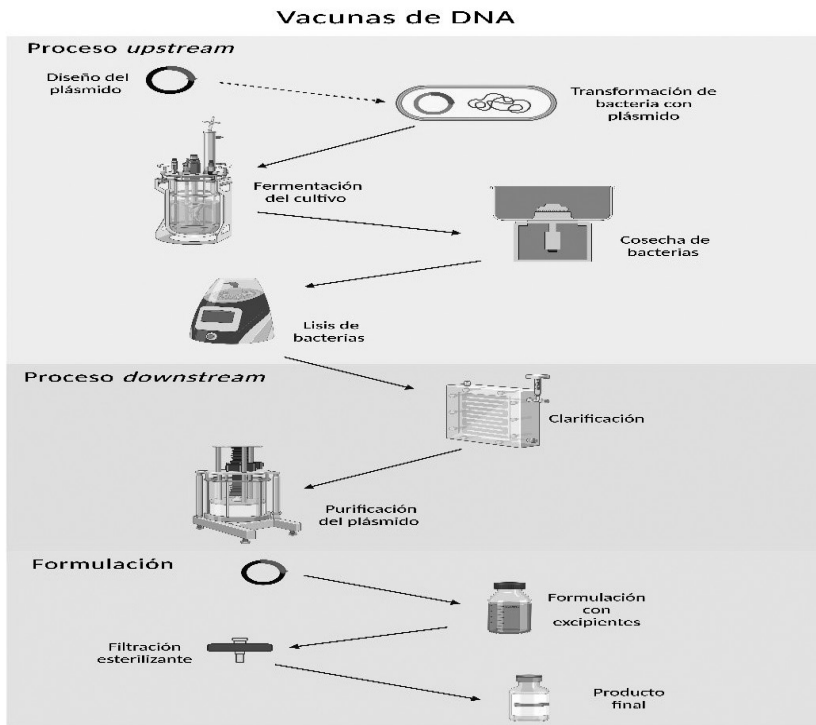
DNA de Doggybone

A diferencia del proceso de producción de los otros constructos de DNA para las vacunas, el proceso de producción del DNA de Doggybone es enzimático. El plásmido de DNA donde se encuentra el casete de expresión eucariota está flanqueado por extremos teloméricos (Tel-L y Tel-R). Como primer paso, este plásmido es desnaturalizado con NaOH y el DNA con el casete de expresión eucariota se somete a amplificación de círculo rodante (RCA). Luego los concatámeros de DNA de doble cadena amplificados se escinden y unen con la protelomerasa TelN, resultando moléculas de doble cadena lineales cerradas de manera covalente. Finalmente, las moléculas de DNA de Doggybone se purifican por cromatografía y se formulan como plásmidos de DNA.

Formulación de los medios de entrega

La entrega del DNA es un paso fundamental para garantizar que se genere una respuesta inmune eficiente. Existen diversos medios de entrega, como son la electroporación, lípidos, polímeros, vectores virales, entre otros. Los adenovirus son virus de DNA no envueltos, pueden infectar a una amplia gama de células y son fáciles de modificar genéticamente, por lo cual han sido utilizados como vectores. No obstante, existen consideraciones para su uso, por ejemplo, el nivel de inmunidad generada contra el vector, ya que los adenovirus son patógenos respiratorios que circulan normalmente. Por otro lado, una estrategia para incrementar la inmunogenicidad es adicionar algunos adyuvantes, como son ligandos de TLRs, inulina o quitosana (véase figura 1).

FIGURA 1. PROCESO DE FABRICACIÓN DE VACUNAS DE DNA



El proceso de fabricación de vacunas se divide en *upstream*, *downstream* y *formulación*. La fase *upstream* comprende el diseño, verificación y generación del plásmido; la fase *downstream* se enfoca en la purificación y concentración del plásmido; y finalmente la fase de *formulación* se enfoca en realizar la mezcla con excipientes y el envasado del producto final.

Proceso de fabricación de vacunas de mRNA

La tecnología de las vacunas de mRNA es sumamente precisa, como ya se había mencionado, es debido a que solo se expresa un antígeno específico y se induce una respuesta inmune directa, tanto inmune celular como humoral. En comparación con las vacunas de DNA, las vacunas de mRNA son más efectivas debido a que no requieren entrar al núcleo, por lo que son más seguras al no existir la posibilidad de que se integre al genoma observándose una expresión transitoria de los antígenos codificados, ya que el mRNA es rápidamente degradado por la célula.

Las vacunas de mRNA utilizan una tecnología de entrega no viral ofreciendo gran versatilidad. El mRNA utilizado es producido mediante síntesis *in vitro* a través de un proceso enzimático. De manera similar a las vacunas de DNA, el proceso de manufactura se puede dividir en tres pasos generales:

- ♦ *Upstream*: en este paso se genera el mRNA.
- ♦ *Downstream*: el antígeno generado es separado de las impurezas mejorando la seguridad y estabilidad.
- ♦ *Formulación*: se preparan todos los componentes para una entrega eficiente.

Proceso upstream

Diseño y generación del plásmido

El diseño de un plásmido (pDNA) es el primer y más importante paso del proceso de fabricación de las vacunas de mRNA. Este plásmido debe contener un RNA polimerasa dependiente de DNA y la secuencia deseada para la construcción del mRNA. Generalmente, el pDNA es amplificado en células bacterianas como *E. coli*, seguido de un proceso de purificación. Una vez obtenido el plásmido con las regiones de interés, este debe ser linealizado para que pueda ser utilizado por la RNA polimerasa como *templete* y sintetizar el mRNA. El proceso de linearización se logra digiriendo el pDNA con enzimas de restricción. Este proceso es importante para evitar eventos transcripcionales en marcos de lectura que pudieran generar mRNA indeseados.

Transcripción *in vitro*

En este paso, el pDNA linearizado funge como *template* para la síntesis del mRNA. Dentro de los componentes que requieren para esta reacción enzimática tenemos a los elementos que participan en el proceso natural de transcripción, como la RNA polimerasa, nucleótidos trifosfatados y cofactores contenidos en una solución tamponada. Una vez transcrito, el mRNA, al igual que en el proceso celular, requiere la adición de una caperuza en la región 5' la cual le proveerá estabilidad y permitirá que sea eficientemente traducido en la célula. La caperuza puede ser añadida de manera cotranscripcional, añadiendo análogos de caperuza y guanosina trifosfato a la mezcla de la reacción, o puede ser añadida en una segunda reacción enzimática utilizando una enzima denominada *capping vaccinia*. En la actualidad existen kits comerciales que permiten la adición de forma cotranscripcional.

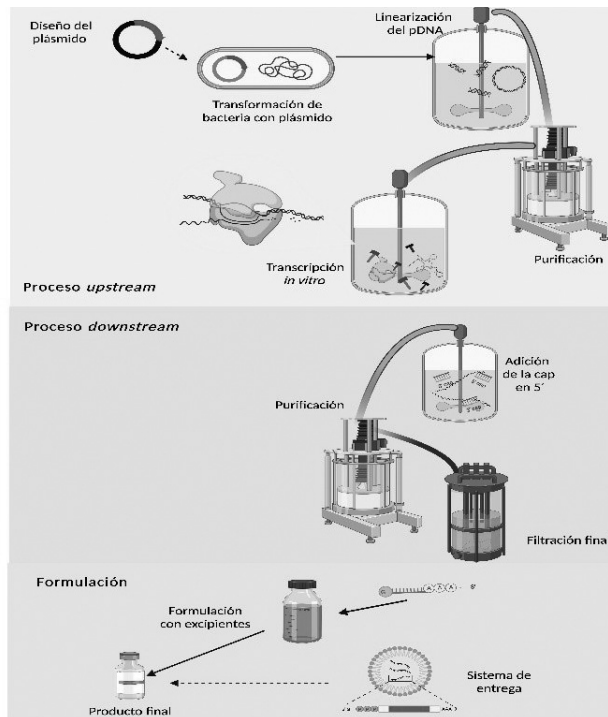
Proceso *downstream*

Purificación del mRNA

Una vez obtenido, el mRNA debe ser aislado y purificado mediante múltiples pasos hasta cumplir con los estándares de pureza (véase figura 2). En producción a pequeña escala se suelen utilizar métodos para eliminar el DNA mediante la digestión con DNAsas, seguido de una precipitación con cloruro de litio (LiCl); sin embargo, mediante este método no se logran eliminar las especies aberrantes de mRNA o RNA de doble cadena. Debido a ello, en procesos industrializados se suele recurrir a técnicas como la cromatografía en fase reversa, en la cual el esqueleto de azúcar-fosfato cargado negativamente se aparea con componentes de la fase móvil. Después de realizar lavados es necesario eluir en un medio idóneo para mantener la estabilidad del mRNA, por lo que las técnicas de cromatografía suelen ser las de primera elección debido a que son sumamente selectivas y eficientes, obteniendo productos con alta pureza. La remoción de impurezas de tamaño pequeño generalmente se logra con filtraciones mediante tangencial o cruzado. Cada método se enfoca en la eliminación de impurezas específicas, y debido a la escalabilidad de este proceso, los métodos

de purificación a escoger dependen de la técnica realizada. Finalmente, se puede realizar una filtración final para maximizar la eficiencia de la reacción y la concentración, así como para maximizar la pureza, el mRNA purificado se transfiere a un buffer apropiado para la formulación o almacenamiento.

FIGURA 2. PROCESO DE FABRICACIÓN DE VACUNAS DE MRNA



El proceso de fabricación de vacunas se divide en *upstream*, *downstream* y *formulación*. La fase *upstream* comprende el diseño y generación del plásmido de expresión, así como de la transcripción *in vitro* y adición de la cap en el extremo 5'; la fase *downstream* se enfoca en la purificación y filtración de las moléculas de mRNA; y finalmente la fase de *formulación* se enfoca en sistema de entrega, la mezcla con excipientes y el envasado del producto final.

Formulación de los medios de entrega

El medio escogido para la entrega o dispensación del mRNA es indispensable para garantizar que este logre entrar en la célula una vez que la vacuna es administrada. Usualmente se usa un sistema de entrega que consiste en una combinación

de lípidos y polímeros. Estos incluyen complejos de oligonucleótidos unidos a lípidos, formando moléculas denominadas *lipoplex*, o polímeros positivamente cargados como polietilenimina. También se suelen usar nanopartículas lipídicas (LNP, del inglés *lipid nanoparticles*), así como diversos adenovirus.

Ensayos clínicos y vacunas aprobadas basadas en ácidos nucleicos

Actualmente, no existen vacunas de DNA aprobadas completamente para su uso en humanos. La excepción es una vacuna contra covid-19 (ZyCoV-D) que fue autorizada para uso de emergencia en la India, que representa un avance histórico para estas vacunas, aunque aún no se han publicado los datos revisados por pares que describan la seguridad y la eficacia de esta vacuna.

Hasta mayo de 2022, existían cerca de 150 registros (ClinicalTrials.gov) sobre ensayos clínicos enfocados a la generación de vacunas basadas en DNA. La mayoría se han centrado en enfermedades infecciosas, como la influenza, el VIH, el citomegalovirus, la hepatitis C, el papiloma humano, el zika (ZIKV), el ébola, el MERS-CoV y el SARS-CoV-2. De acuerdo con el registro, tres ensayos clínicos se encuentran en fase 4, todos ellos enfocados al SARS-CoV-2. La tabla 3 describe cuatro estudios representativos de esta plataforma y sus principales hallazgos.

TABLA 3. ENSAYOS CLÍNICOS REPRESENTATIVOS DE VACUNAS BASADAS EN DNA

REFERENCIA	PATOLOGÍA	OBJETIVO	HALLAZGOS PRINCIPALES
NCT00991354/ NCT00528489	VIH-1	Evaluar la inmunogenicidad de constructos de DNA sintético que codifican las proteínas gag, pol y env del clado B del VIH-1 (vacuna PENNVAX-B) sola o en combinación con el plásmido que codifica IL-12.	La vacunación fue segura y bien tolerada. La adición de IL-12 codificada por plásmido molecular (pIL-12) permite el ahorro de dosis al tener mayor inmunogenicidad. Generación de células T específicas contra VIH después de tres inmunizaciones.

REFERENCIA	PATOLOGÍA	OBJETIVO	HALLAZGOS PRINCIPALES
NCT02840487	ZIKA	Evaluar la seguridad e inmunogenicidad de plásmidos de DNA que codifican las proteínas PrM y E del virus ZIKV (vacuna VRC-ZKDNA085-00-VP).	Inducción de títulos importantes de anticuerpos neutralizantes e inmunidad de células T.
NCT01609998	Influenza estacional	Evaluar la vacuna VRC- FLUDNA063-00-VP, que consta de tres macromoléculas de DNA plasmídico, que expresan secuencias completas de influenza HA en niños y adolescentes.	Segura y bien tolerada. En niños, el régimen de 4 mg de DNA-IV3 dio indicios de una gran cantidad de anticuerpos neutralizantes.
CTRI/2021/01/0304 16	covid-19	Evaluación de vacuna de DNA de tres dosis que codifica la proteína SARS- CoV-2 S y el péptido señal IgE.	Datos preliminares muestra seguridad e inmunogenicidad.

Respecto a vacunas basadas en RNA (mRNA), hasta la fecha, existen 24 registros en ClinicalTrials.gov. Entre ellos, los ensayos se dirigen principalmente al estudio de la seguridad y eficacia de vacunas contra la influenza, la COVID-19, carcinomas, MERS, cáncer de próstata hormono-refractario y melanomas.

La pandemia de covid-19 y la secuenciación del SARS-CoV-2 permitieron el desarrollo acelerado de las primeras vacunas de mRNA aprobadas (BNT162b2/ Pfizer-BioNTech y mRNA-127/Moderna) en 2020, siendo la vacuna BNT162b2 la primera en obtener la autorización completa para su uso en humanos por la FDA. La tabla 4 describe tres estudios representativos de esta plataforma y sus principales hallazgos.

TABLA 4. ENSAYOS CLÍNICOS REPRESENTATIVOS DE VACUNAS BASADAS EN DNA

REFERENCIA	PATOLOGÍA	OBJETIVO	HALLAZGOS PRINCIPALES
NCT03076385	Influenza	Evaluar la seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad de una vacuna de mRNA contra los virus de influenza H10N8 y H7N9.	Tasas de seroconversión muy altas, lo que demuestra una inmunidad profiláctica robusta en humanos. Los eventos adversos (EA) fueron leves o moderados con ningún evento grave.
NCT01817738	Cáncer de próstata	Determinar si la vacuna CV9104 derivada de RnActive® prolonga la supervivencia en pacientes con cáncer de próstata metastásico asintomático.	Perfil de seguridad favorable. Inducción de respuesta inmune innata y humoral.
NCT04368728	Covid-19	Estudio para evaluar la seguridad, la tolerabilidad y la inmunogenicidad de múltiples formulaciones de BNT162b2 contra la covid-19 en adultos sanos.	Un régimen de dos dosis de BNT162b2 otorgó una protección del 95% contra la covid-19 en personas de 16 años o más.

Con base en lo anteriormente descrito, resalta la importancia de la investigación para el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación que conduzca a la disminución de efectos adversos, mejor respuesta inmunitaria a largo plazo, disminución de costos y facilidades de distribución, con el propósito de controlar las enfermedades infecciosas y mejorar la salud pública.

Referencias

Bahl, K., Senn, J. J., Yuzhakov, O., Bulychiev, A., Brito, L. A., Hassett, K. J., Laska, M. E., Smith, M., Almarsson, Ö., Thompson, J., Ribeiro, A., Watson, M., Zaks, T. y Ciaramella, G. (2017). Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 25(6), 1316-1327. <https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2017.03.035>

- Kalams, S. A., Parker, S. D., Elizaga, M., Metch, B., Edupuganti, S., Hural, J., De Rosa, S., Carter, D. K., Rybczyk, K., Frank, I., Fuchs, J., Koblin, B., Kim, D. H., Joseph, P., Keefer, M. C., Baden, L. R., Eldridge, J., Boyer, J., Sherwat, A. y Weiner, D. B. (2013). Safety and comparative immunogenicity of an HIV-1 DNA vaccine in combination with plasmid interleukin 12 and impact of intramuscular electroporation for delivery. *The Journal of Infectious Diseases*, 208(5), 818-829. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIT236>
- Kowalski, P. S., Rudra, A., Miao, L. y Anderson, D. G. (2019). Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. *Molecular Therapy*, 27(4), 710. <https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2019.02.012>
- Kwon, H., Kim, M., Seo, Y., Moon, Y. S., Lee, H. J., Lee, K. y Lee, H. (2018). Emergence of synthetic mRNA: In vitro synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine. *Biomaterials*, 156, 172-193. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2017.11.034>
- Maruggi, G., Zhang, C., Li, J., Ulmer, J. B. y Yu, D. (2019). mRNA as a Transformative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 27(4), 757-772. <https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2019.01.020>
- Qin, F., Xia, F., Chen, H., Cui, B., Feng, Y., Zhang, P., Chen, J. y Luo, M. (2021). A Guide to Nucleic Acid Vaccines in the Prevention and Treatment of Infectious Diseases and Cancers: From Basic Principles to Current Applications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FCCELL.2021.633776/FULL>
- Rosa, S. S., Prazeres, D. M. F., Azevedo, A. M. y Marques, M. P. C. (2021). mRNA vaccines manufacturing: Challenges and bottlenecks. *Vaccine*, 39(16), 2190-2200. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2021.03.038>
- Shafaati, M., Saidijam, M., Soleimani, M., Hazrati, F., Mirzaei, R., Amirheidari, B., Tanzadehpanah, H., Karampoor, S., Kazemi, S., Yavari, B., Mahaki, H., Safaei, M., Rahbarizadeh, F., Samadi, P. y Ahmadyousefi, Y. (2021). A brief review on DNA vaccines in the era of COVID-19. *Future Virology*, 17(1), 49-66. <https://doi.org/10.2217/FVL-2021-0170>
- Trimble, C. L., Peng, S., Kos, F., Gravitt, P., Viscidi, R., Sugar, E., Pardoll, D. y Wu, T. C. (2009). A phase I trial of a human papillomavirus DNA vaccine for HPV16+ cervical intraepithelial neoplasia 2/3. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(1), 361-367. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1725>

- Vaysse, L., Harbottle, R., Bigger, B., Bergau, A., Tolmachov, O. y Coutelle, C. (2004). Development of a self-assembling nuclear targeting vector system based on the tetracycline repressor protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 5555-5564. <https://doi.org/10.1074/JBC.M311894200>
- Würtele, H., Little, K. C. E. y Chartrand, P. (2003). Illegitimate DNA integration in mammalian cells. *Gene Therapy*, 10(21), 1791-1799. <https://doi.org/10.1038/SJ.GT.3302074>
- Zafrir, Y., Agmon-Levin, N., Paz, Z., Shilton, T. y Shoenfeld, Y. (2012). Autoimmunity following hepatitis B vaccine as part of the spectrum of “Autoimmune (Auto-inflammatory) Syndrome induced by Adjuvants” (ASIA): analysis of 93 cases. *Lupus*, 21(2), 146-152. <https://doi.org/10.1177/0961203311429318>

Biomateriales y nanopartículas de uso médico

Scarlett Elizabeth López Álvarez
Estefanía Domínguez Fonseca
Edgar Benjamín Figueroa Ochoa

Alberto Gutiérrez Becerra
Lourdes Mónica Bravo Anaya

Introducción a los biomateriales

Los materiales naturales, sintéticos o híbridos, diseñados y utilizados para fines médicos, tanto en terapias como en diagnóstico, son conocidos como biomateriales. Se ha demostrado que el uso de biomateriales en aplicaciones médicas permite dar tratamiento a distintos tipos de enfermedades, a reemplazar tejidos y a crear implantes médicos, como dentales, de cadera, válvulas, etc. Por lo general, los biomateriales pueden ser clasificados en metales, cerámicas, compósitos y polímeros. Los biomateriales metálicos son, por lo general, de titanio, circonio, oro, plata y platino. Dichos biomateriales han sido ampliamente utilizados como grapas, placas, alambres, prótesis de articulación, implantes dentales y placas craneales. Las cerámicas son biomateriales con una alta biocompatibilidad, buena resistencia a la corrosión y una conductividad térmica y eléctrica baja, entre otras propiedades; por lo tanto, las cerámicas son utilizadas como sustitutos óseos. Algunos ejemplos de materiales cerámicos contienen lo siguiente: óxido de aluminio, óxidos de titanio, fosfatos de calcio, etc. Los biomateriales compósitos son una combinación de al menos dos materiales con diferentes propiedades físicas y químicas y son actualmente de gran interés en la liberación controlada de principios activos y para la cicatrización de heridas. Algunos ejemplos de biomateriales compósitos son los metales con

revestimientos cerámicos y materiales revestidos con carbono. Los biomateriales a base de polímeros son actualmente los materiales sintéticos e híbridos más utilizados en la medicina. Los polímeros se utilizan como biomateriales y pueden ser tanto de origen natural (quitosano, gelatina, alginato y ácido hialurónico) como de origen sintético (metacrilatos/acrilatos, por ejemplo). Al combinar estos polímeros, los biomateriales se pueden ajustar a las propiedades deseadas que son importantes para los sistemas de transporte y entrega de principios activos controlados por aplicaciones biomédicas, biomateriales para la regeneración y reparación de tejidos, polímeros antimicrobianos, entre otros. Dentro de los biomateriales poliméricos se encuentran los biopolímeros, los cuales son producidos mediante fuentes naturales, ya sea sintetizados por reacciones químicas a partir de un material biológico o completamente biosintetizados por organismos vivos. Las tres principales familias de los biopolímeros sintetizados por los seres vivos son las proteínas, los polisacáridos y los ácidos nucleicos.

Nanopartículas a base de biomateriales: nanopartículas poliméricas y sus aplicaciones médicas

Actualmente, las terapias médicas a base de biomateriales poliméricos son de gran importancia en el campo de la medicina clásica y nanomedicina en áreas como la ingeniería de tejidos y el desarrollo de vectores para la administración de principios activos en terapias contra el cáncer y enfermedades neurodegenerativas, entre otras. Las ventajas de esta tecnología para la nanomedicina incluyen mayor funcionalidad, especificidad, y en algunos casos, bajo costo y biocompatibilidad. Existe una gran variedad de nanoestructuras a base de biomateriales poliméricos que se han diseñado para distintas aplicaciones médicas, por ejemplo, el uso de complejos electrostáticos de polielectrolitos para el transporte y la liberación de genes, el desarrollo de nanogeles y estructuras micelares sensibles a estímulos para el transporte de principios activos tales como moléculas hidrofóbicas.

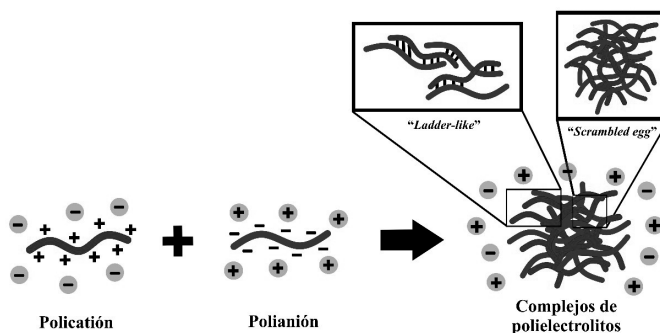
Complejos de polielectrolitos para el transporte de genes

Para comprender y abordar el tema de los complejos electrostáticos a base de polímeros, es importante conocer inicialmente lo que son los polielectrolitos. Estas macromoléculas son polímeros que contienen grupos ionizables y se dividen en policationes (con cargas positivas) y polianiones (con cargas negativas). En solventes polares, como el agua, los grupos ionizables de los polielectrolitos se disocian, otorgándole cargas positivas o negativas a las cadenas del polímero y liberando así diversos contraiones en la solución. Los polielectrolitos naturales son polímeros obtenidos a partir de reacciones bioquímicas naturales llevadas a cabo en animales o plantas. Dentro de los polielectrolitos naturales se encuentran las proteínas, los polisacáridos y los ácidos nucleicos.

Complejos de polielectrolitos (PECs)

La interacción entre dos polielectrolitos de carga opuesta lleva a la formación de complejos de polielectrolitos (PECs), la cual generalmente da como resultado una nanodispersión ópticamente homogénea y estable con tamaños de partícula del orden de los nanómetros. Se han propuesto dos modelos para explicar la organización supramolecular de las cadenas poliméricas en los PECs. El primer modelo es conocido como el modelo de tipo escalera (*ladder-like*), el cual tiene un empaque de cadenas ordenado. El segundo modelo es conocido como huevo revuelto (*scrambled egg*) y presenta un empaque desordenado de las cadenas de polielectrolitos, tal y como se ilustra en la figura 1.

FIGURA 1. MECANISMO DE FORMACIÓN DE LOS PEC



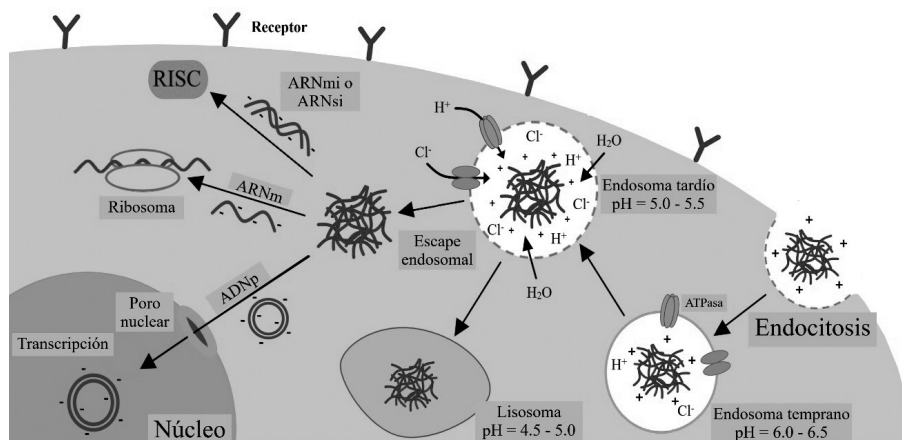
Se muestran los dos posibles modelos que adquieren las cadenas poliméricas: el modelo tipo escalera de empaque ordenado y el modelo de huevos revueltos de empaque desordenado. Fuente: imagen adaptada de Kulkarni *et al.* (2016).

Aplicaciones de los PECs

Debido a que los PECs pueden formarse con una gran variedad de polielectrolitos con estructuras y propiedades diferentes, estos presentan una amplia gama de aplicaciones en diferentes áreas tecnológicas y científicas, como en la biomedicina, farmacia, biotecnología, cosméticos, biomateriales, etc. Por ejemplo, en el área médica se utilizan como vectores o sistemas transportadores de fármacos para enzimas o ácidos nucleicos (ADN y ARN). Además, los PECs se pueden utilizar para el aislamiento y fraccionamiento de proteínas, en las membranas para diálisis, como imitadores de enzimas, en el desarrollo de biosensores, en los hidrogeles para el suministro de proteínas y péptidos, así como en el desarrollo de vacunas para mejorar su respuesta inmunitaria, etcétera.

En la terapia génica, el interés que han despertado los vectores no virales, como los liposomas, polielectrolitos y dendrímeros, se debe principalmente a que estos materiales no presentan problemas de inmunogenicidad, en comparación con los vectores virales. La unión entre un ácido nucleico, como el ADN, cuyas cargas son negativas debido a sus grupos fosfatos, y un polímero catiónico es un claro ejemplo de la formación de PECs. Dichos materiales presentan grandes aplicaciones potenciales en la actualidad. Entre algunos de los sistemas de PECs más estudiados están los que utilizan la polietilenimina (PEI), el quitosano y la poli-L-lisina (PLL) como vectores para compactar y proteger al ADN. En la figura 2 se ilustra el recorrido que siguen los PECs basados en polímeros catiónicos una vez que llegan a las células para lograr que el material genético cumpla su fin terapéutico.

FIGURA 2. PROCESO DE LA ENTREGA DE GENES BASADO EN POLÍMEROS CATIÓNICOS



Incluye la absorción intracelular de los complejos mediante endocitosis, el escape endosomal al citoplasma, la liberación de los ácidos nucleicos del polímero y su transporte al sitio de acción (citoplasma o núcleo). Fuente: imagen adaptada de Bus *et al.* (2018).

Ensayos clínicos de terapia génica

Inicialmente, la terapia génica fue propuesta para tratar enfermedades genéticas, sin embargo, actualmente el cáncer cuenta con el mayor número de ensayos clínicos mediante este tipo de terapias. La terapia génica consiste en el transporte de genes terapéuticos, mediante el uso de vectores, a pacientes con la finalidad de curar enfermedades que no cuentan con una estrategia efectiva de curación y que en la mayoría de los casos es mortal. Una pequeña porción de los ensayos clínicos de terapia génica de 2010 a 2020 fue dirigida hacia el tratamiento de algunas de las enfermedades infecciosas más graves, como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o la malaria. Sin embargo, la aparición de la pandemia de la enfermedad por coronavirus (covid-19) resultó en el inicio de 29 ensayos que abordan la covid-19 desde diciembre de 2019. Las enfermedades infecciosas con mayor número de ensayos clínicos son las siguientes: SIDA, covid-19, malaria, ébola, hepatitis C, infección por el virus del papiloma humano y hepatitis B.

A manera de ejemplo, un portador de genes que fue desarrollado con éxito para la inmunoterapia del ovario epitelial mediante la expresión mejorada de la citocina interleucina-12 fue el polietilenglicol-polietilenimina-colesterol

(PEG-PEI-colesterol). Sin embargo, la formación de nanopartículas con lípidos y ácidos nucleicos representa actualmente la mayoría de los ensayos clínicos entre las nanopartículas para el transporte y la liberación de genes. Cabe mencionar que la modificación química de los policationes y estructuras lipídicas catiónicas, mediante la unión de ciertos grupos funcionales, es un enfoque que se ha propuesto ampliamente para mejorar la selectividad. La PEG-ilación, es decir, conjugación de una o más moléculas de poli(etilen glicol), es una de las modificaciones más comunes para obtener nanopartículas con una larga circulación. Además, la presencia de transferrina y diferentes ligandos específicos permiten obtener también nanopartículas multifuncionales y dirigidas a células diana.

Actualmente, hay cientos de terapias génicas en ensayos clínicos para diferentes enfermedades. La Sociedad Americana de Genes y Terapia Celular (American Society of Gene & Cell Therapy) cuenta con una lista de centros de terapia génica en Estados Unidos, la cual está destinada a pacientes que buscan tratamientos de terapia génica para enfermedades raras. Esta lista excluye la oncología (cáncer) debido a la amplia gama de cánceres y la cantidad de centros que trabajan en ellos. Algunos ejemplos de enfermedades con tratamientos en fases clínicas son los siguientes: beta talasemia, coroideremia, hemofilia, amaurosis congénita de Leber (LCA), mucopolisacaridosis (MPS I, MPS II), anemia drepanocítica, atrofia muscular espinal (AME), entre otras.

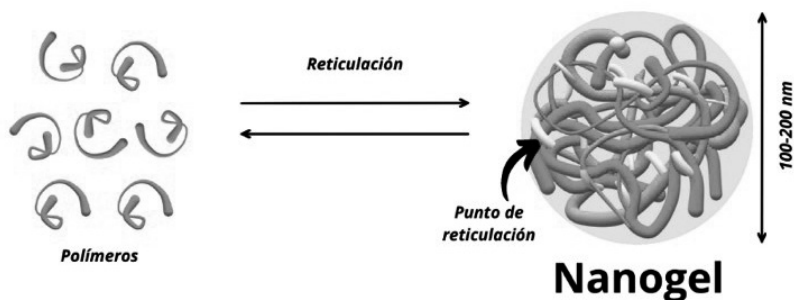
Nanogeles para el transporte y liberación de fármacos

Los nanogeles son redes de polímeros entrecruzados en las que se puede almacenar una cantidad importante de agua. Estas nanoestructuras son en realidad hidrogeles a escala nanométrica, ya que sus tamaños de partícula se encuentran, por lo general, en el intervalo de 100 a 200 nm y están compuestos por polímeros reticulados a través de sus grupos funcionales (véase figura 3). Dentro de la red tridimensional formada por el entrecruzamiento

de los polímeros, es posible encapsular fármacos y transportarlos a sitios específicos para un tratamiento médico. Por lo tanto, los nanogeles se encuentran actualmente en investigación para el desarrollo de nuevos sistemas de transporte y liberación de fármacos.

La liberación controlada de principios activos puede llevarse a cabo mediante la degradabilidad y el cambio de volumen de los nanogeles en respuesta a estímulos, por ejemplo, pH, temperatura, potencial redox y presencia de biomoléculas tales como enzimas o glucosa al encontrarse en microambientes celulares específicos. Otras propiedades interesantes de los nanogeles son su síntesis sencilla y su baja toxicidad.

FIGURA 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE UN NANOGEL



Al lado izquierdo se encuentran los polímeros iniciales y al lado derecho se muestra el nanogel sintetizado con sus puntos de reticulación.

Los nanogeles elaborados con polímeros degradables o sensibles a estímulos tienen una capacidad de respuesta reversible o irreversible, dependiendo de la estructura química utilizada para el diseño del nanogel. Por lo general, los nanogeles son caracterizados por su hinchamiento y su encogimiento cuando se encuentran en un medio acuoso (véase figura 4). El cambio de volumen de los nanogeles, generado por cualquiera de los dos mecanismos, es útil para la liberación del fármaco. Los nanogeles que están hinchados pueden liberar el fármaco por difusión, mientras que, al encogerse, se ven obligados a expulsar el fármaco.

FIGURA 4. CAPACIDAD DE LOS NANOGELES DE MODIFICAR SU TAMAÑO EN UN AMBIENTE ACUOSO

Los nanogeles pueden incorporar 30% en peso o más, de moléculas biológicas y fármacos a través de interacciones electrostáticas, interacciones de tipo Van der Waals y/o hidrofóbicas o mediante enlaces covalentes con las cadenas poliméricas. En los últimos años, se ha logrado un progreso significativo en la aplicación de nanogeles como portadores de pequeñas moléculas biológicamente activas. Por ejemplo, se exploraron nanogeles catiónicos de PEG-polietilenimina (PEG-PEI) reticulada para la inmovilización de compuestos biológicamente activos cargados negativamente, como el ácido retinoico, la indometacina o el ácido valproico. Los nanogeles catiónicos han surgido como una nueva clase prometedora de nanomateriales para abordar los desafíos del transporte y la liberación de oligonucleótidos (ON) *in vivo*. Dichos ON terapéuticos, incluidos los oligodesoxinucleótidos antisentido (ODN), los ARN pequeños de interferencia (ARNsi) y los micro-ARN (miARN), son de interés emergente para el tratamiento y diagnóstico del cáncer, trastornos neurodegenerativos e infecciones virales letales.

La versatilidad estructural de los nanogeles, su alto contenido de agua, las propiedades de transporte similares a los fluidos y la biocompatibilidad de los materiales que los constituyen, convierten a los nanogeles en portadores ideales para varias sondas de imágenes y agentes de contraste. La introducción de múltiples grupos funcionales en el interior o en la superficie de los nanogeles permite la incorporación/conjugación de múltiples colorantes, moléculas indicadoras o nanopartículas inorgánicas. Los nanogeles también permiten la encapsulación de una gran cantidad de nanopartículas magnéticas, lo que puede conducir a la generación

de campos magnéticos locales mucho más fuertes. Desde el momento de su descubrimiento, los nanogeles han recorrido un largo camino y han encontrado aplicaciones en muchos de los campos biomédicos: la farmacoterapia, la obtención de imágenes y el diagnóstico. Algunas formulaciones basadas en nanogeles han llegado a ensayos clínicos para la administración subcutánea de antígenos de vacunas, sin embargo, la traducción clínica de los nanogeles para otras aplicaciones aún está por realizarse. Varios parámetros afectan la eficiencia de este tipo de sistema de administración y requieren una mayor optimización. La distribución en el tejido de los nanogeles depende de una serie de parámetros, como su tamaño, forma, carga, composición, propiedades superficiales y las moléculas que transportan.

Los nanogeles se están utilizando actualmente en tratamientos contra el cáncer para mejorar la administración de fármacos. Los nanogeles cargados de doxorubicina (DOX) son un ejemplo de sistema de administración de fármacos que ha mostrado un buen desempeño en la actividad anticancerígena. Por otro lado, a medida que la población envejece, los trastornos neurodegenerativos, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral múltiple y los accidentes cerebrovasculares van en aumento. En este contexto, el transporte y entrega de polinucleótidos al cerebro ha sido demostrada utilizando nanogeles. La eficiencia en el transporte de dichos nanogeles mejora significativamente cuando la superficie se cambia con transferrina o insulina. Finalmente, se ha observado en estudios *in vivo* que los nanogeles que transportan insulina son más efectivos que la insulina libre para mantener los niveles de glucosa en sangre y reducir las oscilaciones del azúcar en la sangre (reducción de niveles de glucosa en sangre en ratas diabéticas en 51% con respecto a los estudios *in vivo* iniciales).

Nanopartículas micelares como vectores de medicamentos hidrofóbicos

Las micelas son estructuras anfifílicas formadas por moléculas que presentan una región hidrofílica y otra hidrofóbica, las cuales tienen la capacidad de ensamblarse y formar estructuras esféricas, elipsoides, cilíndricas o unilaminares

de tamaño nanométrico. El estudio de estos sistemas ha adquirido una gran relevancia debido a su potencial uso para diagnosticar y tratar enfermedades como el cáncer. Las micelas han demostrado mejorar la eficiencia terapéutica de algunos tratamientos contra el cáncer, debido a su capacidad para administrar medicamentos poco solubles en agua, mejorar la estabilidad del fármaco, así como generar una buena penetración y especificidad de sitio.

Formación micelar

Las suspensiones coloidales de las micelas se forman espontáneamente a determinadas condiciones de concentración y temperatura a partir de agentes anfifílicos o tensioactivos, cuyas moléculas cuentan con dos regiones bien definidas con afinidades opuestas hacia un determinado disolvente. Las estructuras micelares generalmente presentan tamaños de partícula entre los 5 a 50 nm. Los polímeros más empleados para construir núcleos que contengan fármacos hidrofóbicos son los poliéteres, poliésteres y poli(aminoácidos) (PAAs).

Micelas terapéuticas

Este tipo de micelas deben ser capaces de liberar su contenido de los endosomas al citoplasma celular después de la endocitosis, debido a que la exposición prolongada de las micelas en los endosomas y lisosomas que contienen nucleasas y un pH ácido podría afectar la actividad terapéutica de las micelas confinadas. Por este motivo, el éxito de las micelas depende en gran medida del escape endosomal y, por consiguiente, la liberación de los ácidos nucleicos al citoplasma o al núcleo. Existen dos mecanismos propuestos para explicar el escape endosomal de las micelas poliméricas. El primero se conoce como el efecto de esponja de protones, y explica el incremento de la presión osmótica y la alteración de las vesículas endosomales debido al aumento de los protones e iones de cloruro que entran durante la acidificación de los endosomas y lisosomas, a causa de la capacidad amortiguadora del polímero. El segundo mecanismo trata de la desestabilización de las membranas endosomal/lisosomal ocasionada por las interacciones electrostáticas entre los fosfolípidos aniónicos que forman la membrana de las vesículas intracelulares y los polímeros catiónicos. Se cree

que dichas interacciones terminan por perturbar la estructura de la vesícula y permiten que las micelas escapen al citoplasma.

Actualmente, las micelas poliméricas que se encuentran bajo ensayos clínicos se basan en la administración de fármacos potentes, pero poco solubles en agua, para diferentes tratamientos contra el cáncer, como el cáncer de mama. Por ejemplo, el paclitaxel (PTX) es uno de varios medicamentos que se utilizan en distintos tratamientos contra el cáncer. Para mejorar su eficiencia, se desarrolló una nanoplataforma de PTX llamada Genexol TM- PM, cargando PTX en micelas poliméricas basados en PEG-b-PLA (poli[etilenglicol]-b- poli[ácido láctico]). Se encontró que el tamaño de estas micelas es de alrededor de 25 nm y están actualmente en ensayos clínicos para varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama. Por otro lado, se han desarrollado micelas poliméricas con doxorrubucina (NK911), en donde la doxorrubucina se conjugó covalentemente con PEG-b-P(Asp) y están siendo utilizadas principalmente para el cáncer de páncreas metastásico. Se ha investigado también la actividad de micelas cargadas de doxorrubucina (SP1049C) contra el cáncer gastrointestinal. Otra formulación de micelas poliméricas, NC-6300 (NanoCarrier Co., Ltd., Chiba, Japón), fue desarrollada para tratar cánceres metastásicos. Dichas nanoplataformas fueron preparadas mediante la conjugación covalente de la epirrubucina (EPB) con el sistema polimérico de copolímero de bloque PEG-poliaspartato (PEG-b-P[Asp]), con un enlace de hidrazona lábil en medio ácido.

Respuesta a estímulos externos

Las micelas poliméricas pueden ser diseñadas para responder a estímulos particulares (pH, temperatura, luz, ultrasonido) con el propósito de obtener el control espaciotemporal de sus funciones, como informar las condiciones que presenta su entorno, liberar su carga y aplicar sus efectos terapéuticos. Estos estímulos se pueden presentar de forma endógena en el cuerpo e intensificarse o bien expresarse claramente en los tejidos enfermos. En las micelas poliméricas se pueden incorporar diferentes funciones que permitan detectar los cambios sutiles de su entorno, ajustando la estructura multicomponente y compartimentada de la micela. Por ejemplo, las micelas poliméricas que están diseñadas para responder a los cambios de pH, usualmente son equipadas con grupos ionizables o enlaces

escindibles por pH que son neutros o estables a $\text{pH}=7.4$, pero que se protonan o hidrolizan rápidamente a un pH ligeramente ácido.

Por ejemplo, se combinaron polímeros PEG-b-PAEMA-PDMA sensibles al pH con verde de indocianina (ICG), Fe_3O_4 y ácido palmitoil ascórbico (PA) para formar portadores de nanofármacos. Se encontró que los transportadores permanecieron estables a pH fisiológico, mientras que el fármaco transportado se liberó mediante la conversión de carga; finalmente, la captación de células tumorales en el entorno tumoral ácido fue altamente promovida. Los resultados de los experimentos con células tumorales *in vivo* e *in vitro* mostraron que el transportador de nanofármacos tuvo una alta tasa de apoptosis e inhibió significativamente el crecimiento tumoral. Otro ejemplo de sistema a base de micelas poliméricas sensibles al pH fue propuesto para la administración citosólica de doxorrubicina (DOX). Dicho sistema está compuesto por dos polímeros de bloque, 1,2- diestearoil-sn-glicero-3-fosforiletanolamina-PEG y pH- poli(histidina) sensible (PHis)- PEG. El PHis es un polímero sensible al pH que presenta una naturaleza anfótera por su capacidad de protonación-desprotonación. Dichos polímeros permitieron la estabilización de las micelas a un pH extracelular (pHe) neutro y tumoral, y facilitaron la desintegración de las micelas mismas para enseguida permitir la liberación rápida de la doxorrubicina en respuesta al pH endocítico bajo.

Aplicación clínica de micelas poliméricas para el tratamiento del cáncer

La primera generación de micelas poliméricas se dirige hacia la solubilización de compuestos hidrofóbicos. Un ejemplo de copolímero a bloque utilizado para llevar a cabo dicha función es el PEG-b-poli(D,L-ácido láctico) (PEG-PLA). Como se mencionó anteriormente, el paclitaxel, un fármaco utilizado para el tratamiento del cáncer, cargado en PEG-PLA (Genexol TM en micelas poliméricas) llega a ser solubilizado en el núcleo de las micelas, y disminuye la toxicidad asociada a la administración de Cremophor® (uno de los vehículos más utilizados para la solubilización de fármacos hidrofóbicos). En 2007, la primera formulación micelar fue aprobada en Corea del Sur. Dicha formulación fue utilizada en el tratamiento del cáncer de mama y el cáncer de pulmón de células no pequeñas. El Genexol

TM-PM (*polymeric micelles*, micelas poliméricas) es una formulación a base del copolímero a bloques mPEG-b-poli(D,L-ácido láctico) con paclitaxel encapsulado en el núcleo de las micelas. A partir de la aprobación del GenexolTM-PM, varias formulaciones de micelas poliméricas han iniciado ensayos clínicos. Algunos ejemplos de formulaciones a base de este tipo de sistema de nanopartículas que están en investigación clínica son los siguientes: poli(etilenglicol)-bloque-poli(ácido aspártico) (PEG-b-pAsp) cargado con doxorubicina (NK911) o con paclitaxel (NK105), y poli(etilenglicol)-bloque-poli(ácido glutámico) (PEG-b-pGlu) cargado con cisplatino (NC-6004), SN-38 (NK012) u oxaliplatino (NC-4016).

Nanopartículas elaboradas a partir de derivados hidrofóbicos de polisacáridos

Las nanopartículas elaboradas mediante el uso de derivados de polisacáridos se estudian actualmente en áreas que van desde la química de polímeros hasta la investigación de materiales, sobre todo para aplicaciones biomédicas avanzadas. Dichas nanopartículas son materiales muy interesantes y prometedores, los cuales presentan los beneficios únicos de los biopolímeros naturales. En contraste con los nanomateriales artificiales, tales como los derivados de polímeros sintéticos o materiales inorgánicos, los polisacáridos no son considerados tóxicos, son biocompatibles y pueden ser modificados químicamente para introducir moléculas de interés como fluoróforos. Estas características representan un gran interés para las aplicaciones biomédicas de las nanopartículas, así como la administración de fármacos, su uso como agentes de contraste, entre otras.

Las nanopartículas a base de polisacáridos han sido diseñadas y estudiadas para aplicaciones biomédicas, tales como la liberación controlada dirigida de fármacos. Actualmente, los materiales que cuentan con polisacáridos presentan grandes ventajas para dichas aplicaciones gracias a su biocompatibilidad y biodegradabilidad naturales, así como a su origen biológico en comparación de los materiales sintéticos. La biocompatibilidad de los polisacáridos se atribuye a su carácter hidrofílico. La modificación de polisacáridos nativos para producir moléculas anfífilas es uno de los métodos más destacados para producir nanoestructuras autoensambladas.

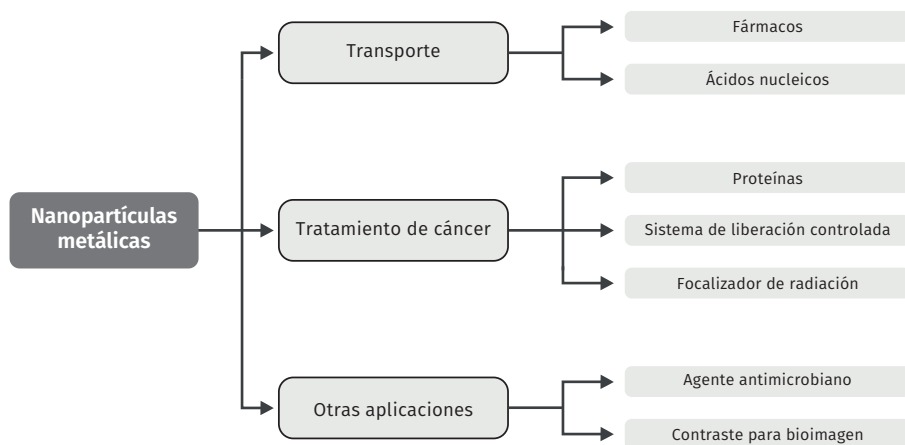
Los polisacáridos anfifílicos se autoensamblan en respuesta a un cambio de acuerdo al equilibrio hidrofílico/hidrofóbico. Dos consideraciones importantes en la administración de fármacos son mejorar la biodisponibilidad y reducir la toxicidad y/o efectos secundarios del fármaco administrado. Muchos de los tratamientos contra el cáncer son hidrofóbicos y tóxicos. El cuerpo humano tiene una tendencia a eliminar compuestos hidrófobos y tóxicos a través del metabolismo hepático. Para lograr el objetivo de la liberación de fármacos, se han reportado dos métodos distintos utilizando este tipo de nanopartículas. El primer método consiste en una unión covalente del fármaco o principio activo a la cadena principal del polisacárido que forma la nanopartícula; en cambio, el segundo método consiste en la encapsulación física dentro de la nanopartícula.

Debido a que la aplicación oral es la vía preferida para la mayoría de las formulaciones de fármacos, se utilizaron nanopartículas a base de etilcelulosa cargado con piroxicam, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, en evaluaciones *in vitro* e *in vivo*. En comparación con una formulación de fármaco comercial, las nanopartículas mostraron una liberación más lenta del fármaco en los experimentos *in vitro* y redujeron significativamente la irritación gástrica en los estudios *in vivo* en ratas. También se demostró que las nanopartículas cargadas con nimesulida, otro fármaco antiinflamatorio no esteroideo, preparados a partir de etilcelulosa mediante un proceso de emulsión- evaporación, son hemocompatibles. Recientemente, se fabricaron nanopartículas conjugadas de pectina-doxorrubicina mediante autoensamblaje, para el tratamiento del carcinoma hepatocelular. Se confirmó la eficiencia de dichas nanopartículas mediante diferentes estudios *in vivo* e *in vitro*. Se estima que las nanopartículas puedan disminuir significativamente el efecto secundario letal de la doxorrubicina (DOX). Por otro lado, se sabe que el cáncer colorrectal es muy común en personas de 60 a 70 años. Para superar este problema, la curcumina muestra propiedades muy interesantes en el tratamiento del cáncer de colon con nanopartículas a base de polisacáridos. Investigaciones recientes muestran que las nanopartículas a base de pectina y curcumina presentan mayor estabilidad, solubilidad y actividades biológicas en propiedades anticancerígenas. Varios agentes naturales anticancerígenos pueden encapsularse en nanopartículas de pectina con actividad anticancerígena.

Nanopartículas metálicas con aplicaciones médicas

Muchos metales están presentes en los organismos vivos, desempeñando actividades esenciales para el funcionamiento adecuado de estos sistemas. A pesar de la importancia que tienen los metales en una variedad de funciones biológicas, cuando existe un exceso de ellos en el organismo se puede presentar citotoxicidad. Se ha propuesto el uso de metales en forma de nanopartículas para el tratamiento de enfermedades por las características únicas que presentan las nanopartículas como consecuencia de sus reducidas dimensiones. La figura 5 resume las aplicaciones de las nanopartículas metálicas en la medicina.

FIGURA 5. REPRESENTACIÓN DE LAS APLICACIONES DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS EN BIOMEDICINA



Fuente: adaptado de Barui, Kotcherlakota y Patra (2018); Kłębowski et al. (2018).

Transporte y liberación de principios activos

Las nanopartículas metálicas han sido propuestas como vehículos para el transporte de fármacos, ácidos nucleicos para terapia génica y proteínas. Para dicho propósito, las nanopartículas de oro han atraído mucha atención por la

facilidad con la que se pueden variar sus características, como su tamaño y su forma, así como su conjugación con moléculas como polímeros biocompatibles, secuencias de oligonucleótidos y proteínas. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que estas modificaciones pueden, a su vez, modificar la toxicidad de las nanopartículas, además de su naturaleza no biodegradable. La plata y el paladio son otros metales que, en forma nanoparticulada, también se han propuesto para el transporte de fármacos, en especial de agentes quimioterapéuticos como la doxorrubicina y el cisplatino.

En los últimos años, se ha observado un gran crecimiento en las aplicaciones emergentes de nanopartículas de Ag (AgNP) como agentes antivirales, debido a su eficiencia inhibidora contra numerosos virus, incluidas ciertas cepas de hepatitis, coronavirus, influenza, herpes, virus de la inmunodeficiencia humana, entre otros. Las AgNP presentan distintas ventajas en comparación con los fármacos químicos convencionales que se dirigen a los virus; específicamente, pueden adherirse a las glicoproteínas de la superficie viral y entrar en las células huésped, en donde presentan una actividad virucida al interactuar con el genoma viral. Chandrakala *et al.* diseñaron un sistema de administración del medicamento zanamivir a base de nanopartículas de Ag (AgNP). Dicho medicamento se usa comúnmente para tratar y prevenir el virus de la influenza. También se propuso la funcionalización de la superficie de las AgNP con amantadina (fármaco antiviral aprobado por la FDA) para evitar la resistencia mostrada por el virus H1N1. En comparación con los tratamientos con un solo fármaco, el autoensamblaje de la amantadina y el zanamivir sobre la superficie de las AgNP produce un mejor potencial inhibidor de la actividad de la neuraminidasa y la hemaglutinina.

Por otro lado, la alta porosidad de las nanopartículas de Pd es una propiedad de gran interés para cargar fármacos contra el cáncer. El fármaco terapéutico se puede conjugar indirectamente con las nanopartículas de Pd mediante una molécula de enlace. Por ejemplo, se han desarrollado portadores sensibles al pH a base de nanopartículas de paladio con doxorrubicina, los cuales exhibieron una liberación de doxorrubicina mediada por el pH en el compartimento endosomal de células de cáncer de cuello uterino resistentes a los medicamentos.

Terapia anticáncer basada en radiación

El transporte de agentes quimioterapéuticos no es la única manera en la que las nanopartículas metálicas se pueden emplear en el tratamiento del cáncer; también encuentran aplicaciones en la radioterapia, cuyo objetivo es destruir las células cancerosas al someterlas a una cantidad destructiva de radiación. En este caso, las nanopartículas de oro o de plata aumentan los efectos de la radiación en las zonas tumorales y con esto aumentan la eficiencia de la radioterapia. Las nanopartículas de Au pueden administrar múltiples moléculas de fármacos, proteínas recombinantes, vacunas o nucleótidos en sus objetivos y pueden controlar la liberación de fármacos a través de estímulos biológicos (internos) o activación de luz (externa). Se sabe que las nanopartículas de Au son un nanoportador eficaz para diversos fármacos, como péptidos, ácidos desoxinucleicos de plásmidos (pDNA), proteínas, ácidos ribonucleicos de interferencia pequeños (siRNA) y agentes quimioterapéuticos. Las nanopartículas de oro pueden desempeñar un papel importante en la radioterapia y la quimioterapia, utilizadas comúnmente en el tratamiento del cáncer, debido a que pueden ser utilizadas como potenciadores de la dosis de radiación y portadores de fármacos contra el cáncer. La bleomicina, antibiótico que detiene o desacelera el crecimiento de células cancerígenas en el cuerpo, es un ejemplo de fármaco modelo, que puede conjugarse fácilmente en nanopartículas de oro a través de un enlace oro-tiol. Actualmente, se considera que las nanoplateformas basadas en nanopartículas de oro tienen la capacidad de administrar dosis terapéuticas de forma controlada, y minimizan la toxicidad para los órganos y tejidos sanos.

Bioimagen

La bioimagen es una técnica que permite diagnosticar enfermedades por la diferencia de densidad entre los tejidos sanos y aquellos que han sido afectados. Como resultados de esta diferencia de densidad, se genera un contraste entre ellos, mismo que es mejorado al usar sustancias conocidas como agentes de contraste. Entre las aplicaciones de las nanopartículas metálicas en la bioimagen se encuentra la sustitución del yodo como agente de contraste por nanopartículas

de plata, las nanopartículas de óxidos metálicos como agentes de contraste y el uso de nanopartículas de oro para el diagnóstico por bioimagen y tratamiento simultáneo con terapia fototérmica.

Agentes antimicrobianos

Es conocida la actividad antibacterial y fungicida de las nanopartículas de plata por su capacidad de dañar la membrana celular de estos organismos. De manera similar, las nanopartículas de oro y de platino pueden evitar la proliferación bacteriana, aunque su aplicación en este ámbito es menos extendida.

Toxicidad de las nanopartículas metálicas

Para emplear las nanopartículas metálicas en sus aplicaciones clínicas es necesario tomar en cuenta varios aspectos toxicológicos, como la concentración y la cantidad de exposición a las nanopartículas. Si estas son altas, se inducirá toxicidad en el organismo. La toxicidad de las nanopartículas se define como su habilidad para afectar la función y la estructura de los órganos. La vía de administración también influirá en la exposición a las nanopartículas, pues cada vía tiene mecanismos de absorción, distribución y excreción distintos. Finalmente, la toxicidad de las nanopartículas metálicas dependerá de la degradabilidad de estas. Aunque la mayoría son lo suficientemente estables para ser metabolizadas en el organismo, se han encontrado algunas que son biodegradables.

Conclusiones

Este capítulo describe, de manera general, la clasificación de los biomateriales como son los nanogeles para el transporte y liberación de fármacos, nanopartículas micelares sensibles a estímulos como vectores de medicamentos hidrofóbicos, las nanopartículas a base de derivados hidrofóbicos de polisacáridos y nanopartículas basadas en metales, todas ellas con importantes aplicaciones médicas. Actualmente, existe un gran número de terapias génicas que utilizan estos nanomateriales como vectores para fármacos o ácidos nucleicos en

ensayos clínicos para diferentes enfermedades, de las cuales las más importantes son cáncer y enfermedades crónico degenerativas. Su principal ventaja es que no presentan problemas de inmunogenicidad y en su mayoría no son tóxicos. Algunos de los nanomateriales han sido diseñados para responder a estímulos tales como el pH, temperatura, luz, ultrasonido, los cuáles pueden presentarse de forma endógena en el cuerpo o expresarse en tejidos enfermos. Los enormes beneficios reportados en el uso de estas terapias permiten ofrecer a los pacientes alternativas de tratamiento exitosas para enfermedades como cáncer y enfermedades neurodegenerativas que hasta hace algunos años parecían imposibles de curar.

Referencias

- Arabi, F., Mansouri, V. y Ahmadbeigi, N. (2022) Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 153, 113324. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113324.
- Barui, A. K., Kotcherlakota, R. y Patra, C. R. (2018). Medicinal Applications of Metal Nanoparticles. En S. Thota y D. C. Crans (Eds.), *Metal Nanoparticles: Synthesis and applications in pharmaceutical sciences* (pp. 101-153). First. Wiley-VCH. DOI: 10.1002/9783527807093.ch5.
- Bus, T., Traeger, A. y Schubert, U. S., (2018). The great escape: how cationic polyplexes overcome the endosomal barrier. *Journal of materials chemistry. B*, 6(43), 6904-6918. <https://doi.org/10.1039/c8tb00967h>
- Cabral, H., Miyata, K., Osada, K. y Kataoka, K. (2018). Block Copolymer Micelles in Nanomedicine Applications. *Chemical reviews*, 118(14), 6844-6892. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00199>
- Chandrakala, V., Aruna, V. y Angajala, G. (2022). Review on metal nanoparticles as nanocarriers: current challenges and perspectives in drug delivery systems. *Emergent materials*, 5(6), 1593-1615. <https://doi.org/10.1007/s42247-021-00335-x>
- Chen, J., Guo, Z., Tian, H. y Chen, X. (2016). Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery. *Molecular therapy. Methods & clinical development*, 3, 16023. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.23>

- Deshantri, A. K., Varela Moreira, A., Ecker, V., Mandhane, S. N., Schiffelers, R. M., Buchner, M. y Fens, M. H. A. M. (2018). Nanomedicines for the treatment of hematological malignancies. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 287, 194-215. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.08.034>
- Ekkelenkamp, A. E., Elzes, M. R., Engbersen, J. F. J. y Paulusse, J. M. J., (2018). Responsive crosslinked polymer nanogels for imaging and therapeutics delivery. *Journal of materials chemistry. B*, 6(2), 210-235. <https://doi.org/10.1039/c7tb02239e>
- Gericke, M., Schulze, P. y Heinze, T., (2020). Nanoparticles Based on Hydrophobic Polysaccharide Derivatives—Formation Principles, Characterization Techniques, and Biomedical Applications. *Macromolecular Bioscience*, 20(4). DOI: 10.1002/mabi.201900415.
- Hanafy, N. A. N., El-Kemary, M. y Leporatti, S. (2018). Micelles Structure Development as a Strategy to Improve Smart Cancer Therapy. *Cancers*, 10(7), 238. <https://doi.org/10.3390/cancers10070238>
- Huang, G., Mei, X., Xiao, F., Chen, X., Tang, Q. y Peng, D. (2015). Applications of Important Polysaccharides in Drug Delivery. *Current pharmaceutical design*, 21(25), 3692-3696. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150109144613>
- Kalirajan, C., Dukle, A., Nathanael, A. J., Oh, T. H. y Manivasagam, G. (2021). A Critical Review on Polymeric Biomaterials for Biomedical Applications. *Polymers*, 13(17), 3015. <https://doi.org/10.3390/polym13173015>
- Klębowski, B., Depciuch, J., Parlińska-Wojtan, M. y Baran, J. (2018). Applications of Noble Metal-Based Nanoparticles in Medicine. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 4031. <https://doi.org/10.3390/ijms19124031>
- Kulkarni, A. D., Vanjari, Y. H., Sancheti, K. H., Patel, H. M., Belgamwar, V. S., Surana, S. J. y Pardeshi, C. V. (2016). Polyelectrolyte complexes: mechanisms, critical experimental aspects, and applications. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(7), 1615-1625. <https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1129624>
- Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C. y Zhang, Z. (2008). Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, 60(15), 1650-1662. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.001>
- Soni, K. S., Desale, S. S. y Bronich, T. K. (2016). Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 240, 109-126. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.11.009>

Anticuerpos monoclonales: una poderosa herramienta biológica para enfermedades crónicas degenerativas

Fabiola Solórzano Ibarra

Nadia Tatiana García Barrientos

Susana del Toro Arreola

Introducción

Los anticuerpos son glicoproteínas altamente específicas que reconocen un epítipo o determinante antigénico, en particular. En condiciones biológicas son producidos por los linfocitos B después de la estimulación por un antígeno y actúan mediante neutralización, opsonización, inducción de la actividad del complemento y de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales son el tipo más común de anticuerpos terapéuticos. Se producen a partir de una única clona de linfocitos B, lo que da como resultado anticuerpos que son idénticos y altamente específicos contra un antígeno en particular.

En la actualidad, los anticuerpos monoclonales son herramientas importantes en diferentes áreas biomédicas, necesarios para el diagnóstico y clasificación de diferentes tipos de enfermedades tanto infecciosas como no infecciosas; así como para el tratamiento de pacientes con cáncer, enfermedades autoinmunes, trasplante de órganos, profilaxis y tratamiento de enfermedades infecciosas.

El uso de anticuerpos para bloquear moléculas solubles de importancia clínica o la interacción ligando/receptor, direccionar fármacos o unir bidireccionalmente varias células y moléculas son algunos ejemplos; esto ha permitido mejorar el tratamiento de pacientes con enfermedades crónicas. Existen más de 100 anticuerpos aprobados por la FDA (por sus siglas en inglés, Food and Drug Administration) para su uso clínico. Esto nos da un panorama de la importancia de los anticuerpos en el área clínica. A lo largo de este capítulo se describirán las características de los anticuerpos monoclonales y su uso como herramientas terapéuticas.

Generalidades de los anticuerpos

El descubrimiento de los anticuerpos, su rol en la respuesta inmune y su uso en diagnóstico y tratamiento fue a través de una serie de eventos, que iniciaron en 1890 cuando Emil Adolf von Behring y Shibasaburo Kitasato observaron que los animales inmunizados con toxinas diftéricas y tetánicas producían algo en su sangre (antitoxinas) que podía neutralizar o destruir la toxina inicial y, en consecuencia, generar resistencia a la infección. Poco después, en 1897 Paul Ehrlich propuso la teoría de la “cadena lateral” de producción de anticuerpos, la cual planteaba que existían receptores (descritos como “cadenas laterales”) en la superficie de las células que se podían unir específicamente (como una llave y una cerradura) a toxinas y que esta reacción de acoplamiento era la desencadenante de la producción de anticuerpos.

Posteriormente en 1940, Linus Pauling confirmó la teoría de la llave y la cerradura propuesta por Ehrlich, al demostrar que más que la composición química fue la forma de acomodamiento la que dictaba las interacciones antígeno-anticuerpo. Sin embargo, no fue hasta 1948 que Astrid Fagreaus descubrió que las células plasmáticas eran responsables de la producción de anticuerpos. En la década de 1960 continuaron los estudios sobre la estructura molecular de los anticuerpos, Gerald M. Edelman y Joseph Gally confirmaron la existencia de la cadena ligera de los anticuerpos; Edelman demostró además que las

cadenas de los anticuerpos se encontraban unidas mediante puentes disulfuro. También los experimentos de Rodney R. Porter con tratamientos enzimáticos identificaron las dos regiones de los anticuerpos Fab (*antigen binding fragment*) y Fc (*crystallizable fragment*). En 1975, César Milstein y Georges J. F. Köhler generaron el método para la producción de anticuerpos monoclonales. Un año después, en 1976, Susumu Tonegawa y Nobumichi Hozumi propusieron que las regiones variables de las inmunoglobulinas se generan por un rearrreglo del ADN durante la maduración de los linfocitos B; esto permite la producción de anticuerpos específicos para más de mil millones de antígenos diferentes y se produce de forma somática.

En la actualidad se sabe que los anticuerpos o inmunoglobulinas son glicoproteínas producidas por los linfocitos B tras la estimulación con un antígeno, estos pueden estar anclados en la membrana de la célula y funcionar como un receptor para las células B (BCR). Por otra parte, cada linfocito B secreta anticuerpos con una especificidad única para un antígeno en particular. Sin embargo, todos los anticuerpos conservan una estructura básica que se asemeja a una Y (véase figura 1, panel a). Los brazos superiores representan los sitios de unión al antígeno, conocido también como porción Fab, de acuerdo con los experimentos enzimáticos realizados por Rodney R. Porter y Gerald M. Edelman, mientras que la parte inferior de la Y, conocida como porción cristalizable Fc puede ser reconocida por diferentes componentes del sistema inmune (factor C3b del complemento y células que expresan receptores para la porción Fc de algunas inmunoglobulinas).

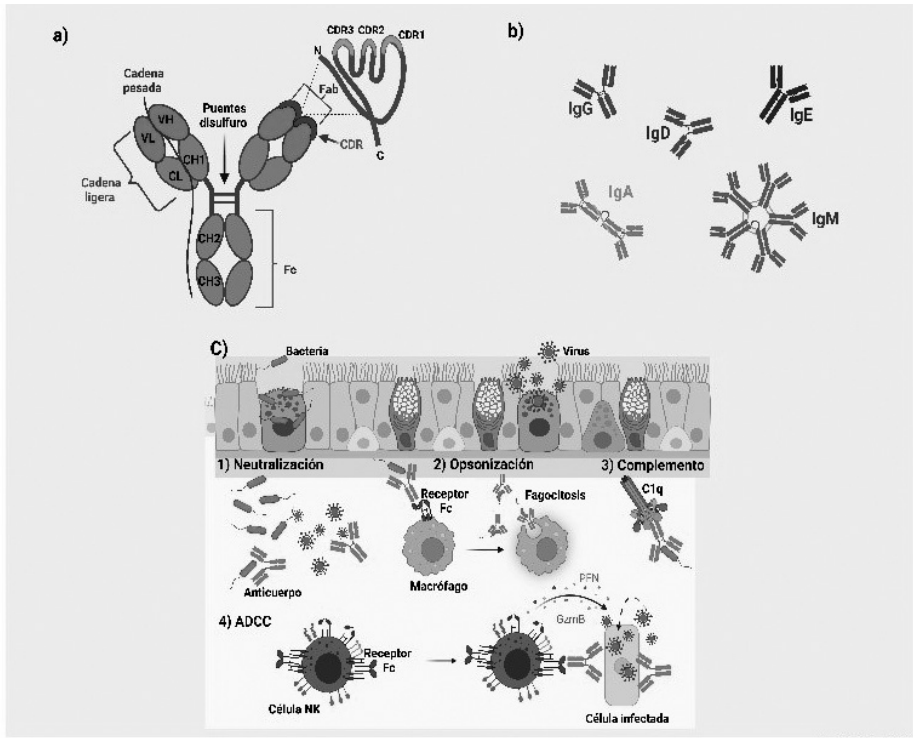
En términos bioquímicos, un anticuerpo consta de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H) idénticas, unidas mediante puentes disulfuro. Las cadenas ligeras se componen de un dominio constante (CL) y un dominio variable (VL), mientras que las cadenas pesadas se componen de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3) y un dominio variable (VH). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera constituyen la parte de la molécula que se une al antígeno. Dentro de los dominios variables existen tres bucles denominados regiones determinantes de la complementariedad o

CDR (por sus siglas en inglés, *complementarity-determining regions*) 1, 2 y 3, que confieren la mayor diversidad y definen la especificidad de la unión del anticuerpo (véase figura 1, panel a)

Existen cinco clases de anticuerpos: IgM (inmunoglobulina M), IgG, IgE, IgD e IgA, que difieren en la estructura química de las regiones constantes de sus cadenas pesadas (véase figura 1, panel b).

Los anticuerpos funcionan de diferentes maneras, una vez que la porción Fab del anticuerpo se une a un microbio, a una partícula viral, a una toxina, etc., la porción Fc permanece libre para poder interactuar con células de la respuesta inmune como macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, células NK y moléculas del complemento. Existen cuatro mecanismos por los cuales los anticuerpos contribuyen en la respuesta inmune frente a patógenos (véase figura 1, panel c): a) la neutralización del patógeno, mecanismo por el cual el anticuerpo actúa bloqueando o capturando el microbio, evitando de esta manera que infecte una célula; b) la opsonización permite que el anticuerpo unido al microbio (por la porción Fab) sea reconocido por células fagocíticas, como los macrófagos que expresan receptores que reconocen la porción Fc de las inmunoglobulinas, esto puede favorecer la fagocitosis del microbio; c) los anticuerpos unidos a un patógeno pueden inducir la activación de la vía clásica del complemento, una vez que el anticuerpo unido es reconocido por el primer factor C1q; d) un anticuerpo puede inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) cuando después de unirse a un antígeno, su porción Fc interactúa con el receptor Fc de células inmunes, como las células NK. Esto hace que la célula NK se dirija a la célula recubierta de anticuerpos para inducir su lisis mediante la exocitosis de gránulos citotóxicos.

FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS ANTICUERPOS Y SUS FUNCIONES BIOLÓGICAS



a) Consiste en dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H) idénticas, unidas mediante puentes disulfuro. Las cadenas ligeras se componen de un dominio constante (CL) y un dominio variable (VL), mientras que las cadenas pesadas se componen de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3) y un dominio variable (VH). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera constituyen la parte de unión al antígeno. b) Existen cinco clases de anticuerpos: IgG, IgD, IgE, IgA e IgM. c) Los anticuerpos contribuyen en la eliminación de microbios y virus patógenos mediante diversos mecanismos como neutralización de bacterias o partículas virales, opsonización, activación de la vía clásica del complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). CDR, regiones determinantes de la complementariedad; Fc, *crystallizable fragment*; Fab, *antigen binding fragment*; IgM, inmunoglobulina M; PFN, perforina; GzmB, granzima B.

Anticuerpos monoclonales (definiciones, historia, producción)

Los anticuerpos monoclonales se producen a partir de una única clona de linfocitos B, por lo cual tienen afinidad por el mismo epítipo (estructura molecular de un antígeno que es reconocida específicamente por el anticuerpo) en un antígeno. Los anticuerpos monoclonales fueron generados por primera vez

en 1975 por César Milstein y Georges Köhler, quienes desarrollaron un método para generar grandes cantidades de anticuerpos monoclonales de una especificidad predefinida (véase figura 2). Ellos fabricaron líneas celulares productoras de anticuerpos mediante la fusión (técnica del hibridoma) de un mieloma de ratón (que carece del gen de la hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa, HGPRT) y células de bazo de ratón inmunizado con glóbulos rojos de oveja. Después, incubaron las células en medio selectivo HAT (con hipoxantina aminopterina timidina) durante dos semanas. Las células de mieloma al no expresar la enzima HGPRT, necesaria para su crecimiento en este medio, y las células B no fusionadas tienen una vida corta, por lo tanto, solo sobreviven las células fusionadas. De esta manera generaron un hibridoma con la inmortalidad de la célula de mieloma y la capacidad de producir anticuerpos específicos para glóbulos rojos de oveja. El cultivo inicial contiene una mezcla de anticuerpos derivados de diversas clonas de linfocitos B, cada una de las cuales secreta su propio anticuerpo con diferente especificidad para el mismo antígeno (anticuerpos policlonales). Sin embargo, cada clona de linfocito se puede separar para obtener cultivos puros. Con esta técnica, Milstein y Köhler generaron varios hibridomas que secretaban cantidades grandes de anticuerpos monoclonales.

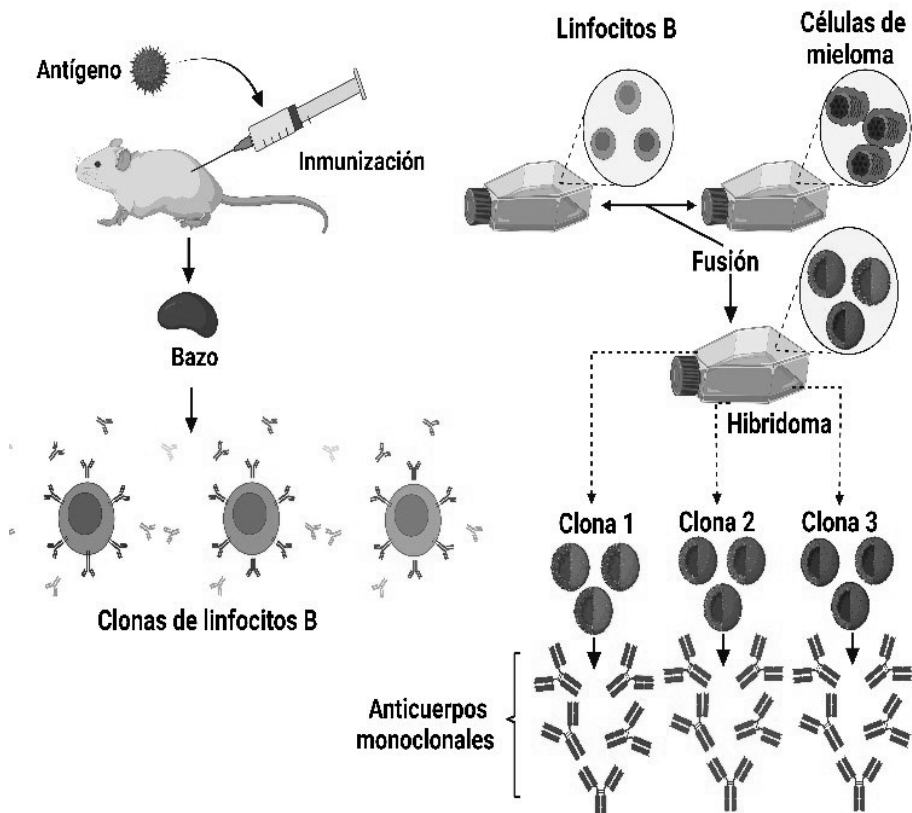
En la actualidad, la mayoría de los anticuerpos monoclonales aprobados para uso terapéutico son versiones humanizadas o quiméricas de anticuerpos de ratón y se generaron mediante tecnología de hibridoma. Es la metodología más exitosa para producir anticuerpos monoclonales, ya que más del 90% de los anticuerpos aprobados por la FDA de los Estados Unidos para uso terapéutico, se generan mediante la tecnología tradicional de hibridomas. Esta tecnología es ampliamente usada por diversas razones; en primera instancia, porque una vez obtenidas las clonas, la producción de anticuerpos se vuelve simple y eficiente. Otra de las ventajas es que los anticuerpos aislados conservan el emparejamiento nativo de la combinación de genes de regiones constantes y variables, ya que los hibridomas se forman usando células B que maduran en órganos linfáticos secundarios en respuesta a un antígeno. Estas células B se someten al proceso natural de maduración, en el que la región variable de anticuerpos se diversifica al acumular hipermutaciones somáticas. Los anticuerpos resultantes poseen el emparejamiento natural de genes variables de cadena pesada y ligera, así como del gen de la región

constante madurado con cambio de clase natural. Al principio, la tecnología se limitaba a los hibridomas de ratones, pero en años posteriores los investigadores utilizaron esta plataforma para el desarrollo de hibridomas en humanos, conejos, pollos, cabras, ovejas, vacas, conejillos de Indias y ratas. Con el paso de los años y con los avances de la ingeniería genética, entre las que se incluye la tecnología de ADN recombinante, como la quimerización y la humanización, los anticuerpos monoclonales de ratón producidos por hibridomas han comenzado a someterse a procesos de humanización a fin de minimizar la composición de los anticuerpos producidos en el ratón y así evitar su inmunogenicidad cuando son administrados a un paciente, y también para mejorar las funciones efectoras de los anticuerpos (interacción con receptores Fc o moléculas del complemento, como ya se describió en el apartado previo). Por otra parte, se han desarrollado nuevos enfoques moleculares para la producción de anticuerpos completamente humanos. Uno de ellos es el uso de animales transgénicos en los que el repertorio de genes de anticuerpos animales se sustituye por genes humanos y mediante la tecnología del hibridoma se generan los anticuerpos. Otro tipo de tecnología completamente diferente a la de la hibridoma, es la denominada *phage display*, la cual fue desarrollada a principios de los noventa por John McCafferty y Gregory Paul Winter. Esta permite generar anticuerpos en bacterias totalmente derivados de humanos y específicos para un antígeno, utilizando fagos filamentosos. De forma general, primero se realiza la creación de bibliotecas combinatorias con las secuencias genéticas de los anticuerpos y su inserción en bacteriófagos. Posteriormente, se infecta una bacteria (ejemplo: *Escherichia coli*) con los fagos y durante la infección, mientras los bacteriófagos se replican dentro de la bacteria huésped, también se producen los anticuerpos.

Como parte de los avances en ingeniería genética, la estructura de los anticuerpos puede ser modificada para mejorar su uso terapéutico, ya que se ha observado que el gran tamaño de los anticuerpos convencionales (aproximadamente 150 kDa) influye en las interacciones biológicas al administrarlo a un paciente. Es por esto que se han generado anticuerpos conformados solamente por los dominios variables (VH y VL) que permiten el reconocimiento

del antígeno. Dos fragmentos variables con especificidad para distintos antígenos pueden también ser fusionados entre sí, generando de esta manera anticuerpos biespecíficos que se unen a dos moléculas diferentes, permitiendo, por ejemplo, la unión de una célula tumoral con un linfocito T CD8+. Las regiones constantes de los anticuerpos también pueden ser modificadas para potenciar sus funciones biológicas, como, por ejemplo, la citotoxicidad mediada por anticuerpos.

FIGURA 2. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES



Los anticuerpos monoclonales son producidos mediante hibridomas. En la figura se muestran los experimentos clásicos para la producción de anticuerpos específicos contra glóbulos rojos de oveja. El protocolo consiste en los siguientes pasos: 1) inmunización de un ratón con glóbulos rojos de oveja, para la obtención de diferentes clones de linfocitos B antígeno-específicos. 2) Fusión de las clones de células B con células de mieloma de ratón (que carece del gen de la hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa (HGPRT)). 3) Incubación de las células en un medio selectivo (con hipoxantina aminopterina timidina) durante dos semanas para seleccionar las células fusionadas.

El uso de los anticuerpos como herramientas terapéuticas y como herramientas para fines de diagnóstico

Anticuerpos terapéuticos

El desarrollo de los primeros anticuerpos terapéuticos comenzó en la década de los ochenta. Muromonab-CD3 (anti-CD3) fue el primer anticuerpo aprobado para uso terapéutico con la finalidad de inducir inmunosupresión y prevenir el rechazo de trasplantes; actualmente, una gran cantidad de anticuerpos con aplicaciones clínicas (véase tabla 1) son empleados para el tratamiento de diversas enfermedades, como cáncer, enfermedades autoinmunes, trasplante de órganos, asma, psoriasis, dermatitis atópica, así como en la profilaxis o tratamiento de enfermedades infecciosas.

Los anticuerpos terapéuticos poseen una especificidad y afinidad por blancos particulares; además, se unen a moléculas presentes de forma soluble o ancladas en las membranas celulares. Esto los convierte en herramientas ampliamente útiles para el tratamiento de diversas enfermedades y abre un camino importante en el área de la medicina personalizada. Los anticuerpos terapéuticos son mayormente monoclonales, solo en circunstancias particulares se emplean anticuerpos policlonales con fines terapéuticos, tal es el caso de los anticuerpos policlonales usados como fármacos antiveneno, para neutralizar una amplia gama de componentes del veneno de serpientes o arácnidos.

En la actualidad existen diferentes tipos de anticuerpos terapéuticos, que pueden ser clasificados de diferentes maneras (véase figura 3). Desde el punto de vista funcional podemos agruparlos en cuatro categorías.

TABLA 1. ANTICUERPOS TERAPÉUTICOS APROBADOS PARA SU USO EN HUMANOS EN ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

ENFERMEDAD	NOMBRE INTERNACIONAL	BLANCO TERAPÉUTICO	MECANISMO DE ACCIÓN	INDICACIÓN
Prevención del rechazo al trasplante	Orthoclone Okt3	CD3	Inhibición (bloqueo)	Trasplante de riñón
	Daclizumab Basiliximab	IL-2R		

ENFERMEDAD	NOMBRE INTERNACIONAL	BLANCO TERAPÉUTICO	MECANISMO DE ACCIÓN	INDICACIÓN
Tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas	Nebacumab	Endotoxina	Inhibición (bloqueo)	Sepsis por gramnegativos
	Palivizumab	VRS		Prevención de la infección por el virus respiratorio sincitial (VRS)
	Raxibacumab	Antígeno protector de B. anthraxis		Infección por ántrax
	Bezlotoxumab	Clostridium difficile enterotoxin B		Prevención de la recurrencia de la infección por Clostridium difficile
	Obiltoxaximab	Antígeno protector de B. anthraxis		Prevención del ántrax por inhalación
	Mogamulizumab Mogamulizumab-kpkc	CCR4		Micosis fungoide o síndrome de Sézary
	Ibalizumab Ibalizumab-uiyk	CD4		Infección por VIH
	Atoltivimab Maftivimab Odesivimab-ebgn	Virus del ébola	Neutralización del virus	Infección por el virus del ébola
	Ansuvimab-zykl	Glicoproteína del virus del ébola		
	Regdanvimab Casirivimab + Imdevimab Xagevimab Cilgavimab	Proteína spike del SARS-CoV-2		Covid-19
Tratamiento de enfermedades autoinmunes	Efalizumab	CD11a	Inhibición (bloqueo)	Psoriasis
	Ustekinumab	IL-12/23		
	Secukinumab Cosentyx Ixekizumab	IL-17a		
	Brodalumab	IL-17R		Psoriasis en placa
	Guselkumab	IL-23		
	Tildrakizumab Tildrakizumab-asmn Risankizumab Risankizumab-rzaa	Unidad p19 de la IL-23		Psoriasis pustulosa generalizada
	Spesolimab	Receptor IL-36		Enfermedad de Crohn
	Infliximab Certolizumab pegol Adalimumab Golimumab	TNF		
	Tocilizumab Sarilumab	IL-6R		Artritis reumatoide

ENFERMEDAD	NOMBRE INTERNACIONAL	BLANCO TERAPÉUTICO	MECANISMO DE ACCIÓN	INDICACIÓN
Tratamiento de enfermedades autoinmunes	Natalizumab	Integrina α_4	Inhibición (bloqueo)	Esclerosis múltiple
	Alemtuzumab	CD52	Lisis mediada por el complemento	
	Ocrelizumab Ublituximab	CD20	Complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	
	Belimumab	BLyS	Inhibición(bloqueo)	Lupus eritematoso sistémico
	Anifrolumab Anifrolumab-fnia	IFNAR1		Enfermedad de Castleman
	Siltuximab	IL-6		Colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn
	Vedolizumab	Integrina $\alpha_4\beta_7$		Dermatitis atópica
	Dupilumab	IL-4R α		
	Tralokinumab Tralokinumab-ldrm	IL-13		Retrasar el inicio de la diabetes tipo 1
	Teplizumab Teplizumab-mzwv	CD3		
Tratamiento del cáncer	Tositumomab-I131	CD20	Movilización de un fármaco (radio isótopo)	Linfoma de no Hodgkin
	Rituximab		Complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	
	Ibritumomab tiuxetan		Movilización de un fármaco (radio isótopo)	
	Brentuximab vedotin	CD30	Movilización de un fármaco antitumoral	
	Polatuzumab vedotin Polatuzumab vedotin-piiq	CD79b	Movilización de un fármaco antitumoral	Linfoma B difuso de células grandes
	Tafasitamab Tafasitamab-cxix	CD19	Complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	
	Loncastuximab tesirine Loncastuximab tesirine-lpyl		Movilización de un fármaco antitumoral	
	Mosunetuzumab	CD20, CD3	Unión biespecífica	Linfoma folicular

ENFERMEDAD	NOMBRE INTERNACIONAL	BLANCO TERAPÉUTICO	MECANISMO DE ACCIÓN	INDICACIÓN
Tratamiento del cáncer	Edrecolomab	EpCAM	Complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	Cáncer de colon
	Catumaxomab	EPCAM,CD3	Unión biespecífica	Ascitis maligna
	Trastuzumab	HER2	Inhibición(bloqueo)	Cáncer de mama
	Pertuzumab		Movilización de un fármaco antitumoral	
	Ado-trastuzumab emtansine		Movilización de un fármaco antitumoral	Cáncer de mama metastásico HER2+
	[fam-]trastuzumab deruxtecan		Inhibición (bloqueo)	
	Fam-trastuzumab deruxtecan-nxki			
	Margetuximab-cmkb			
	Sacituzumab govitecan Sacituzumab govitecan-hziy	TROP-2	Movilización de un fármaco antitumoral	Cáncer de mama triple neg.
	Cetuximab	EGFR	Inhibición (bloqueo)	Cáncer colorrectal
	Bevacizumab	VEGF	Inhibición (bloqueo)	
	Panitumumab	EGFR	Inhibición (bloqueo)	
	Ofatumumab Obinutuzumab	CD20	Complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	Leucemia linfocítica crónica
	Blinatumomab	CD19 Y CD3	Unión biespecífica	Leucemia linfoblástica aguda
	Inotuzumab ozogamicin	CD22	Movilización de un fármaco antitumoral	
	Gemtuzumab ozogamicin	CD3	Movilización de un fármaco antitumoral	
	Moxetumomab pasudotox Moxetumomab pasudotox-tdfk	CD22	Inhibición (bloqueo)	Leucemia de células pilosas
	Ipilimumab	CTLA-4		Melanoma
	Nivolumab	PD-1		
	Pembrolizumab	PD-1		
	Relatlimab	LAG-3		

ENFERMEDAD	NOMBRE INTERNACIONAL	BLANCO TERAPÉUTICO	MECANISMO DE ACCIÓN	INDICACIÓN
Tratamiento del cáncer	Tebentafusp Tebentafusp-tebn	gp100, CD3	Unión biespecífica	Melanoma
	Ramucirumab	VEGFR2	Inhibición (bloqueo)	Cáncer gástrico
	Necitumumab	EGFR		Cáncer de pulmón de células no pequeñas
	Dinutuximab	GD2		Neuroblastoma
	Naxitamab-gqgk	GD2		Neuroblastoma de alto riesgo y enfermedad osteomedular refractaria
	Daratumumab	CD38	Complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	Mieloma múltiple
	Elotuzumab	SLAMF7	Inhibición(bloqueo), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	
	Isatuximab Isatuximab-irfc	CD38		
	Belantamab mafodotin Belantamab mafodotin-blmf	Antígeno de maduración de células B	Complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	
	Teclistamab	Antígeno de maduración de células B, CD3	Unión biespecífica	
	Atezolizumab	PD-L1	Inhibición (bloqueo)	Cáncer de vejiga
	Durvalumab			Carcinoma de células de Merkel
	Avelumab			Carcinoma cutáneo de células escamosas
	Cemiplimab Cemiplimab-rwlc	PD-1		
	Enfortumab vedotin Enfortumab vedotin-efv	Nectin-4	Movilización de un fármaco antitumoral	Cáncer urotelial
	Dostarlimab Dostarlimab-gxly	PD-1	Inhibición (bloqueo)	Cáncer endometrial
	Tisotumab vedotin Tisotumab vedotin-tftv	Factor tisular	Movilización de un fármaco antitumoral	Cáncer de cuello uterino
	Mirvetuximab soravtansine Mirvetuximab soravtansine-gynx	Receptor de folato alfa	Movilización de un fármaco antitumoral	Cáncer de ovarios

ENFERMEDAD	NOMBRE INTERNACIONAL	BLANCO TERAPÉUTICO	MECANISMO DE ACCIÓN	INDICACIÓN
Tratamiento de trastornos metabólicos	Evolocumab	PCSK9	Inhibición (bloqueo)	Hipercolesterolemia
	Alirocumab	PCSK9		
	Evinacumab	Proteína 3 similar a la angiopoyetina		
Tratamiento de otras enfermedades	Abciximab	GPIIb/IIIa	Inhibición (bloqueo)	Prevención de coágulos de sangre en angioplastia
	Omalizumab	IgE		Asma
	Reslizumab	IL-5		
	Benralizumab	IL-5R α		
	Mepolizumab	IL-5		Asma eosinofílico severo
	Tezepelumab	Linfopoyetina estromal tímica		Asma grave
	Tezepelumab-ekko			Degeneración macular
	Ranibizumab	VEGF		Hemoglobinuria paroxística nocturna
	Eculizumab	Proteína del complemento C5		
	Ravulizumab			
	Ravulizumab-cwvz			
	Canakinumab	IL-1β		Síndrome de Muckle-Wells
	Denosumab	RANK-L		Pérdida ósea
	Idarucizumab	Dabigatran		Reversión de la anticoagulación inducida por dabigatrán
	Emicizumab	Factor Ixa, X	Unión biespecífica	Hemofilia A
	Erenumab	Receptor CGRP	Inhibición (bloqueo)	Prevención de la migraña
	Erenumab-aooe			
	Galcanezumab			
	Galcanezumab-gnlm			
	Fremanezumab	FGF23		Hipofosfemia ligada al cromosoma X
Fremanezumab-vfrm				
Eptinezumab				
Eptinezumab-jjmr	Calicreína plasmática			
Burosumab		Angioedema hereditario		
Burosumab-twza				
Lanadelumab		IFNγ		Linfohistiocitosis hemofagocítica primaria
Lanadelumab-flyo				
Emapalumab	Factor de von willebrand	Púrpura trombocitopénica trombótica adquirida		
Emapalumab-lzsg				
Caplacizumab				
Caplacizumab-yhdp				

ENFERMEDAD	NOMBRE INTERNACIONAL	BLANCO TERAPÉUTICO	MECANISMO DE ACCIÓN	INDICACIÓN
Tratamiento de otras enfermedades	Romosozumab Romosozumab-aqqg	Esclerostina	Inhibición (bloqueo)	Osteoporosis en mujeres posmenopáusicas con mayor riesgo de fractura
	Brolucizumab Brolucizumab-dbll	VEGF-A, Ang-2		Degeneración macular asociada con la edad
	Faricimab Faricimab-svoa	VEGF-A, Ang-2	Unión biespecífica	Degeneración macular asociada con la edad, edema macular diabético
	Crizanlizumab Crizanlizumab-tmca	CD62 (también conocido como P-selectina)	Inhibición (bloqueo)	Anemia drepanocítica
	Satralizumab Satralizumab-mwge	IL-6R		Trastorno del espectro de la neuromielitis óptica
	Teprotumumab	IGF-1R		Enfermedad ocular tiroidea
	Teprotumumab-trbw			
	Aducanumab Aducanumab-avwa	Beta amiloide		Alzheimer
	Lecanemab	Protofibrillas beta amiloide		
	Sutimlimab Sutimlimab-jome	Proteína del complemento C1s		Síndrome de aglutininas frías

Anticuerpos de bloqueo

Estos anticuerpos se diseñan para inhibir la función de un receptor al actuar como moléculas de bloqueo, lo que puede favorecer la internalización y la degradación del receptor de superficie celular o el bloqueo de una vía de señalización. En este grupo se incluyen los anticuerpos dirigidos contra los puntos de control inmunológico (*immune checkpoints*, moléculas que regulan la activación de las células T en condiciones fisiológicas y que pueden verse sobreexpresadas en pacientes con cáncer o infecciones crónicas); a estos anticuerpos también se les denomina como inhibidores de puntos de control inmunitario, un ejemplo son los anticuerpos contra el receptor PD1 (por sus siglas en inglés, *programmed death 1*) y su ligando PD-L1 (por sus siglas en inglés, *programmed death-ligand 1*), los cuales fueron los primeros en ser aprobados para su uso en pacientes con cáncer. PD-1 es una molécula que se expresa en linfocitos T y otras células inmunes después de la activación. Mientras que su ligando PD-L1 puede ser expresado por diferentes tipos de células inmunes y no inmunes. La vía PD-1/

PDL-1, en condiciones fisiológicas conduce a la inhibición de la activación aberrante de las células T, evitando de esta manera una respuesta autorreactiva. Sin embargo, este mecanismo es utilizado por los tumores para evadir la respuesta inmune, ya que pueden sobre expresar PD-L1. Es por esto que el uso de anticuerpos como anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 puede bloquear esta vía al evitar la interacción de ambos receptores, evitando que la célula T se inhiba, permitiendo así que se elimine a las células tumorales.

También se han diseñado anticuerpos que bloquean moléculas solubles como las citocinas, tal es el caso del anticuerpo anti-TNF- α (por sus siglas en inglés, *tumor necrosis factor*), que se utiliza en el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide (incluyendo la artritis juvenil idiopática), artritis psoriásica, espondiloartritis axial, enfermedad de Crohn, psoriasis, entre otras. Los anticuerpos anti-TNF- α al ser administrados a los pacientes neutralizan las moléculas de TNF- α soluble, lo cual previene la unión al receptor de TNF α 1 (TNFR1, expresado en todos los tejidos humanos) y TNF α 2 (TNFR2, expresado en células inmunes). TNF α también puede expresarse como proteína unida a la membrana. Por lo cual, los anticuerpos anti-TNF- α al unirse a las células que expresan esta molécula favorecen la lisis mediada por el complemento. De forma general, TNF α es una citocina pleiotrópica que en condiciones fisiológicas regula las respuestas proinflamatorias. Sin embargo, cuando se encuentra sobreexpresada, como ocurre en pacientes con enfermedades autoinmunes, se asocia con el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad. En pacientes con artritis reumatoide esta citocina promueve el reclutamiento de células inmunes; además, induce la activación de los fibroblastos sinoviales que producen catepsinas y metaloproteinasas de matriz. Estas moléculas favorecen la destrucción del cartílago y del hueso, lo que conlleva a la erosión de las articulaciones. Por lo cual, el uso de anticuerpos anti-TNF- α en artritis reumatoide se asocia con una disminución de los síntomas y prevención de la progresión de la enfermedad.

Anticuerpos unidos a fármacos

Estos anticuerpos permiten dirigir el tratamiento a una célula blanco y potenciarlo; son utilizados principalmente para la administración de fármacos oncológicos. El primer anticuerpo aprobado de este grupo fue gemtuzumab

ozogamicina para el tratamiento de leucemia mieloide aguda positiva al marcador mieloide CD33, por lo que este complejo al estar dirigido a CD33, permite entregar el agente antitumoral calicheamicina a las células leucémicas que expresan CD33. La calicheamicina es liberada de forma intracelular en las células que expresan CD33 y actúa favoreciendo la ruptura del DNA bicatenario, lo que irrumpe el ciclo celular e induce la apoptosis de la célula blanco. En comparación al tratamiento sistémico con fármacos quimioterapéuticos, el uso de fármacos acoplados a anticuerpos permite dirigir el tratamiento a las células tumorales y eliminarlas de forma más específica.

Anticuerpos biespecíficos o triespecíficos

Son anticuerpos con dos o tres sitios de unión, están diseñados para reconocer dos antígenos diferentes o dos epítopes diferentes en el mismo antígeno. Esto permite que dos células interactúen, por ejemplo, células tumorales y células de la respuesta inmune, con la finalidad de facilitar la asociación de complejos proteicos o hacer un bloqueo de dos moléculas.

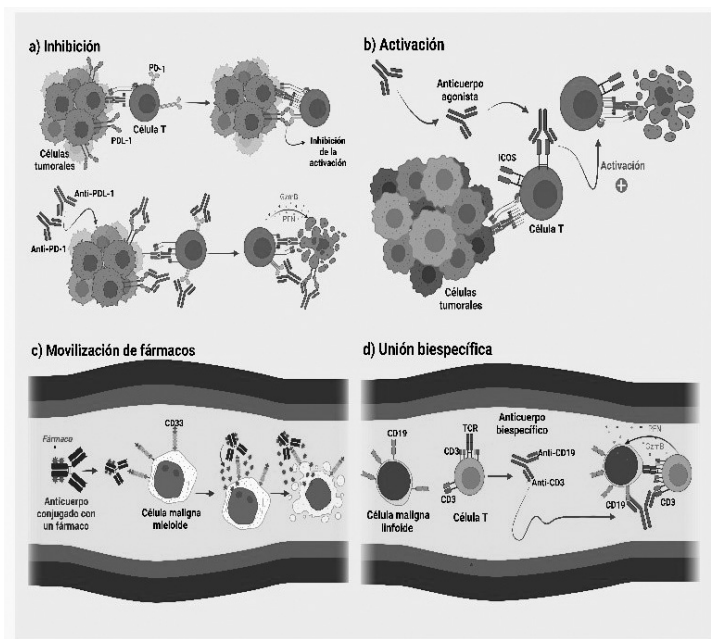
Actualmente, existen nueve anticuerpos biespecíficos aprobados, más de 180 se encuentran en desarrollo preclínico y más de 50 en ensayos clínicos. El primer anticuerpo biespecífico aprobado por la FDA fue el blinatumomab de Amgen para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda. En un sitio, este anticuerpo tiene afinidad por la molécula CD19 (células B) y en el segundo, por la molécula CD3 expresada en las células T, esto permite una interacción directa entre estas dos poblaciones celulares, lo que favorece la eliminación de las células B leucémicas.

Anticuerpos agonistas

Existen anticuerpos agonistas que pueden inducir la activación de un receptor, al actuar precisamente como moléculas agonistas, lo cual permite la activación de una vía. Un ejemplo es el uso de anticuerpos para inducir la activación de células T en pacientes con cáncer. ICOS (por sus siglas en inglés, *inducible T cell co-stimulator*) es un receptor coestimulador importante para la función y supervivencia de las células T activadas y de memoria. La interacción del anticuerpo agonista con

ICOS (expresado en las células T citotóxicas) estimula la señalización mediada por ICOS, lo que favorece la proliferación, supervivencia y actividad citotóxica de células T ICOS+. La activación de la célula T citotóxica en el contexto del cáncer favorece la eliminación del tumor y evita su desarrollo.

FIGURA 3. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS TERAPÉUTICOS DE ACUERDO CON SU MECANISMO DE ACCIÓN



a) Inhibir la función de un receptor; ejemplo: anticuerpos contra moléculas PD-1 y PD-L1 utilizadas en el tratamiento de cáncer. b) Agonistas que activan vías señalización; ejemplo, la activación de células T tras la estimulación del receptor ICOS con anticuerpos agonistas. c) Anticuerpos unidos a fármacos para favorecer la terapia dirigida. Ejemplo: fármaco antitumoral unido a un anticuerpo anti-CD33 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda. d) Anticuerpos con unión inespecífica a dos antígenos o epítopos diferentes. Ejemplo: anticuerpos específicos con afinidad para CD19 y CD3, en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda favoreciendo la interacción de células tumorales y linfocitos T.

Anticuerpos como herramientas para fines de diagnóstico

Desde finales del siglo XIX, los anticuerpos han sido utilizados para el diagnóstico de enfermedades. En 1985, la FDA ya había aprobado 70 pruebas de diagnóstico basadas en la detección de analitos (antígenos) por anticuerpos

monoclonales para su uso en Estados Unidos. Un tercio de estos eran utilizados en pruebas de embarazo caseras, las cuales utilizan anticuerpos para detectar la hormona gonadotropina coriónica humana en la orina.

Por otra parte, los antígenos de interés sobreexpresados en una enfermedad, pueden ser detectados en los fluidos biológicos del paciente (sangre, orina, saliva, esputo, entre otros), así como en biopsias de tejido mediante la utilización de anticuerpos. Por ejemplo, en cáncer de mama, el análisis de receptores hormonales (receptores de estrógeno y progesterona) puede determinar si la paciente responderá o no a tratamientos hormonales y de esta manera administrar la terapia más adecuada. La evaluación de estos receptores se realiza mediante inmunohistoquímica, una técnica que consiste en la detección de la molécula de interés utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales en biopsias de tejidos.

Cuando se trata de determinar una proteína de interés en suero u otros fluidos, las pruebas como ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) permiten detectar y cuantificar la concentración de antígenos, generalmente utilizando anticuerpos monoclonales específicos acoplados a una enzima que en contacto con un sustrato producirá una reacción colorimétrica. La detección cualitativa y cuantitativa de antígenos virales como los del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) puede ser realizada mediante esta técnica. Otro ejemplo de pruebas que permiten la detección cualitativa de antígenos virales son los kits para la detección rápida de SARS-CoV-2 mediante inmunocromatografía en muestras nasofaríngeas o nasofaríngeas/orofaríngeas. Este protocolo se basa en una prueba de ELISA tipo “sándwich”. De forma general, el dispositivo de prueba está formado por una membrana de nitrocelulosa que presenta dos líneas, la línea control “C” y la línea de prueba “T” (*Test*), las cuales están recubiertas con anticuerpos de captura; en el caso de la línea control, el anticuerpo tiene afinidad por un antígeno irrelevante que es poco probable que esté presente en la muestra. Mientras que el anticuerpo que recubre la línea de prueba tiene afinidad por las proteínas de la nucleocápside del SARS-CoV-2. Por otra parte, el dispositivo también contiene un anticuerpo acoplado a un colorante específico para SARS-CoV-2, el cual será el primero en interaccionar con la muestra después de añadirla. En las muestras positivas para el virus, la interacción antígeno-anticuerpo-colorante genera un complejo que migra

por capilaridad hasta la línea de prueba recubierta con el anticuerpo de captura que retiene el complejo, lo cual forma la línea de color visible en presencia del antígeno viral.

Por otra parte, en oncología, la clasificación de leucemias se realiza mediante citometría de flujo, una técnica que utiliza anticuerpos monoclonales o policlonales marcados con fluorocromos para detectar de forma simultánea diferentes proteínas en una célula, y de esta manera fenotipificar las células de los pacientes, también permite evaluar la respuesta al tratamiento y recaídas (enfermedad mínima residual).

Tendencias futuras de los anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos son moléculas importantes para el tratamiento o diagnóstico de una gran diversidad de enfermedades. Continuamente se sigue trabajando para mejorar la producción de anticuerpos y evitar su inmunogenicidad, fenómeno que se observa tras la administración repetida de algunos anticuerpos terapéuticos, hasta en el 70% de los pacientes. Este fenómeno se manifiesta con la generación natural de anticuerpos contra los anticuerpos terapéuticos administrados, lo cual puede causar efectos adversos en el paciente y afectar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas (alterando la biodisponibilidad y eliminación) del anticuerpo terapéutico. A pesar de que el desarrollo de anticuerpos humanizados o completamente humanos ha reducido la inmunogenicidad, no se ha logrado eliminar en todos los casos.

También se está trabajando en la generación de anticuerpos estereoespecíficos, que puedan reconocer la forma tridimensional de los antígenos (y no la forma dimensional, como ocurre con todos los anticuerpos monoclonales terapéuticos actuales). Los anticuerpos estereoespecíficos pueden mostrar una mayor especificidad a los antígenos nativos de las dianas terapéuticas de interés clínico.

Por otra parte, se busca identificar dianas terapéuticas que puedan mejorar el tratamiento de los pacientes. El uso de anticuerpos triespecíficos abre la puerta a terapias más dirigidas, así como los anticuerpos agonistas, que pueden

inducir la activación de células inmunes agotadas. Otro aspecto importante está relacionado con los efectos adversos originados con el tratamiento con anticuerpos terapéuticos. El diagnóstico oportuno, también usando anticuerpos, puede ayudar a elegir a aquellos pacientes que realmente son candidatos para este tipo de tratamientos o realizar el monitoreo del tratamiento.

Referencias

- Ansar, W. y Ghosh, S. (2013). Monoclonal Antibodies: A Tool in Clinical Research. *Indian Journal of Clinical Medicine*, 4, IJCM.S11968. <https://doi.org/10.4137/ijcm.S11968>
- Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C. y Corvaia, N. (2017). Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nature reviews. Drug discovery*, 16(5), 315-337. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.268>
- Doherty, M. y Robertson, M. J. (2004). Some early Trends in Immunology. *Trends in immunology*, 25(12), 623-631. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.10.008>
- Dunkelberger, J. R. y Song, W. C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell research*, 20(1), 34-50. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.139>
- Ecker, D. M., Jones, S. D. y Levine, H. L. (2015). The therapeutic monoclonal antibody market. *mAbs*, 7(1), 9-14. <https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989042>
- Hey, A. (2015). History and Practice: Antibodies in Infectious Diseases. *Microbiology spectrum*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0026-2014>
- Kaplon, H. y Reichert, J. M. (2021). Antibodies to watch in 2021. *mAbs*, 13(1), 1860476. <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1860476>
- Köhler, G. y Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495-497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>
- Labrijn, A. F., Janmaat, M. L., Reichert, J. M. y Parren, P. W. H. I. (2019). Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. *Nature reviews. Drug discovery*, 18(8), 585-608. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0028-1>
- Leavy, O. (2016). The birth of monoclonal antibodies. *Nature Immunology*, 17(1), S13-S13. <https://doi.org/10.1038/ni.3608>
- Liu, J. K. (2014). The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations. *Annals of medicine and surgery* (2012), 3(4), 113-116. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2014.09.001>

- Mayes, P. A., Hance, K. W. y Hoos, A. (2018). The promise and challenges of immune agonist antibody development in cancer. *Nature reviews. Drug discovery*, 17(7), 509-527. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.75>
- Parra, H. A., Shukla, S., Samal, S., Shrivastava, T., Ahmed, S., Sharma, C. y Kumar, R. (2020). Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *International immunopharmacology*, 85, 106639. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106639>
- Reichert, J. M. (2012). Marketed therapeutic antibodies compendium. *mAbs*, 4(3), 413-415. <https://doi.org/10.4161/mabs.19931>
- Sodoyer, R. (2016). The History of Therapeutic Monoclonal Antibodies. En *Biosimilars of Monoclonal Antibodies* (pp. 1-62). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118940648.ch1>
- Stavnezer, J., Guikema, J. E. y Schrader, C. E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annual review of immunology*, 26, 261-292. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090248>

CRISPR/CAS: edición de genomas

Luis Daniel Hernández Ortega
Eber Josué Carrillo Martínez

Raúl Cuauhtémoc Baptista Rosas
Adriana María Salazar Montes

Introducción

Las herramientas de edición génica son parte fundamental de la biomedicina, desde la investigación básica, desarrollo de fármacos, generación de transgénicos, hasta su uso directo en la clínica como terapia génica.

Dentro de las herramientas más novedosas encontramos al Sistema de Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas (CRISPR, por sus siglas en inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), el cual en conjunto a una nucleasa o proteína asociada a CRISPR (Cas, por sus siglas en inglés, *CRISPR-associated protein*) forma un complejo capaz de realizar cortes de doble cadena en secuencias específicas.

En los sistemas sintéticos la direccionalidad del corte se encuentra mediado por una secuencia de RNA guía único (sgRNA, por sus siglas en inglés) mientras que en los sistemas silvestres participan dos secuencias de RNA unidas por complementariedad, una secuencia de 20 nucleótidos de RNA CRISPR (crRNA) y un crRNA transactivador (tracrRNA).

El sistema CRISPR/Cas se encuentra de manera silvestre únicamente en bacterias y arqueas. En conjunto a las enzimas de restricción forman parte de un sistema de defensa natural frente a virus (como los bacteriófagos) y

plásmidos invasores, un equivalente primitivo de lo que sería un sistema inmunológico adaptativo propio. Esto se debe a que los cortes de doble cadena fragmentan el DNA exógeno y lo inhabilitan.

El locus CRISPR se identificó por primera vez en 1987 por un grupo de investigadores japoneses liderado por Yoshizumi Ishino. El descubrimiento ocurrió de manera accidental mientras estudiaban el gen *iap* (*alkaline phosphatase isozyme conversion gene*) en la bacteria *Escherichia coli*.

El descubrimiento se realizó mientras secuenciaban el DNA alrededor del gen *iap*, donde observaron una serie de repeticiones directas de una secuencia corta de DNA. Entre estas repeticiones, encontraron secuencias espaciadoras que no eran repetitivas y parecían ser únicas.

El descubrimiento se publicó en el artículo titulado “Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product” en el *Journal of Bacteriology* en 1987. Aunque el artículo se centraba principalmente en el gen *iap*, mencionaron las repeticiones interespaciadas como una observación interesante, sin comprender completamente su significado o función.

Este descubrimiento inicial fue el primer paso hacia la identificación y comprensión de los loci CRISPR; por otra parte, los genes Cas fueron identificados y estudiados hasta 2002. En 2005, se realizó un descubrimiento muy interesante, se demostró que las secuencias espaciadoras no repetitivas encontradas en el loci de CRISPR eran secuencias derivadas de bacteriófagos y otros elementos extracromosómicos, esto derivó que para 2007 se confirmara que el sistema CRISPR/Cas medía la inmunidad adaptativa de las procariotas frente a bacteriófagos, mediante la integración de material genético exógeno para su posterior detección.

En 2012, se confirmó que las secuencias tracrRNA y crRNA son las encargadas de guiar a Cas9 para realizar los cortes en la secuencia diana, y en 2013 un CRISPR/Cas tipo II fue usado por primera vez para realizar edición genómica en células de mamíferos, pero fue hasta 2016 cuando esta herramienta fue usada por primera vez a tratamientos clínicos. En 2019 el sistema sufrió una mejora significativa al desarrollar la tecnología *prime editing* (editores por cebador) y una más en 2020 con la llegada del *vfCRISPR*, sistemas de los que se hablará más adelante.

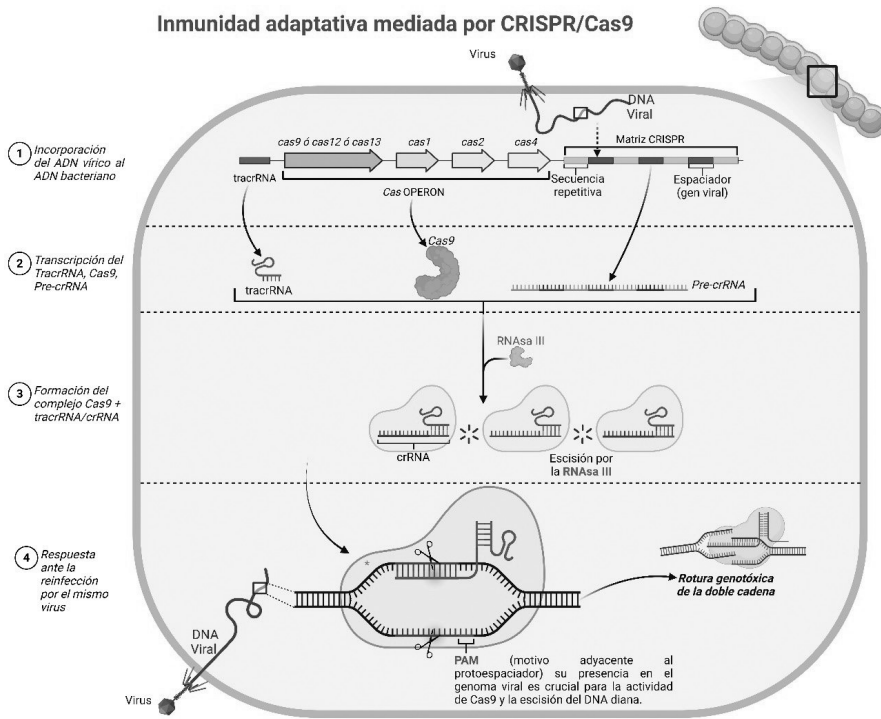
Mecanismo silvestre

En procariotas la inmunidad adaptativa mediada por CRISPR/Cas9 se produce en cuatro pasos (véase figura 1):

1. Adquisición de memoria celular de virus o plásmidos invasores. Después de la infección, una secuencia de DNA del invasor se integra en el locus CRISPR del huésped como matrices espaciadoras flanqueadas por secuencias repetitivas.
2. La RNA polimerasa transcribe RNA a partir de regiones espaciadoras del sitio CRISPR, llamadas RNA pre-CRISPR (pre-crRNA), al mismo tiempo se produce la transcripción del crRNA transactivador (tracrRNA) ubicado corriente arriba del locus CRISPR.
3. El complejo tracrRNA/crRNA se carga en la nucleasa Cas9, formando un complejo ribonucleoproteico activo.
4. Ante la presencia de DNA viral, el complejo identifica la secuencia y se une por complementariedad, además el reconocimiento del motivo adyacente protoespaciador (PAM) es crucial para que Cas9 genere una rotura de doble cadena en el DNA produciendo fragmentación del DNA viral.

Juntos, CRISPR y Cas9 desempeñan un papel fundamental en la resistencia bacteriana a la infección por fagos y la conjugación de plásmidos. Este sistema se ha adaptado para la edición de genes en mamíferos, transformándolo en una herramienta molecular.

FIGURA 1. INMUNIDAD ADAPTATIVA MEDIADA POR CRISPR/CAS9



En presencia de un virus o plásmido invasor este sistema permite generar un método de defensa y de memoria basado en las secuencias de DNA invasoras, por la serie de pasos arriba descritas.

CRISPR/Cas9 como herramienta molecular

A diferencia de los cortes de doble cadena en secuencias virales, los cortes de doble cadena en el DNA genómico de células eucariotas, activan procesos de reparación que pueden incorporar cambios en la secuencia, que a su vez puede llevar a la pérdida de la función del gen. Este principio básico ha sido aprovechado para la modificación génica en diversas especies.

La principal ventaja de CRISPR/Cas9 como herramienta molecular radica en que para cambiar la secuencia objetivo solo requiere cambiar la secuencia del RNA que guía al sistema, esto abre un abanico de posibilidades de la misma magnitud que las secuencias que puedan ser diseñadas.

El sistema CRISPR/Cas se divide en tres tipos principales (tipo I, II y III) y 12 subtipos. El tipo I y III se presentan principalmente en arqueas, el procesamiento del pre-crRNA depende de la presencia de la enzima Cas6 y las enzimas encargadas del corte en la secuencia diana son la Cas3 y Cas6 respectivamente, cuyos métodos de reconocimiento de la secuencia dependen de una serie de pasos y cascadas de complejos multiproteicos enzimáticos guiados por el crRNA, lo cual puede provocar interferencias e incrementa la probabilidad de errores.

Por otra parte, el sistema tipo II es expresado en bacterias (lo que facilita su biosíntesis), el procesamiento del pre-crRNA no depende de la presencia de enzimas Cas se genera a través de una RNasa tipo III endógena y la enzima encargada del corte en la secuencia diana es la Cas9, la cual se puede cargar directamente con el complejo tracrRNA/crRNA formando un complejo ribonucleoproteico activo.

Además, la estructura tracrRNA/crRNA del complejo puede ser cambiada por un RNA guía único (sgRNA), lo que simplifica los componentes del sistema CRISPR y permite que tracrRNA y crRNA sean sintetizados al mismo tiempo en una secuencia disminuyendo el tiempo y la tasa de error.

Para un correcto diseño se debe tomar en cuenta que la secuencia diana debe tener una longitud de 20 pb y siempre se debe encontrar flanqueada por el motivo adyacente protoespaciador (PAM). PAM es un motivo de secuencia corta (2 a 5 pb) adyacente a la secuencia dirigida al sgRNA o crRNA en el DNA de interés. Estos motivos también son reconocidos por los CRISPR tipo I y III.

Para lograr el efecto al interior de la célula diana es necesario introducir las secuencias diseñadas y la proteína Cas9, esto puede ser logrado mediante el desarrollo de un plásmido conteniendo las secuencias del sgRNA, Cas9 y un promotor fuerte, comúnmente el promotor de citomegalovirus (CMV), aunque existen otras aproximaciones, como su envío en plásmidos independientes, la introducción directa de los mRNA o incluso la entrega de la proteína Cas9 con su sgRNA, los sistemas de envío al interior de la célula incluyen vectores virales, liposomas, nanopartículas, microinyección, etc.

Una vez al interior de la célula, el sistema reconoce la secuencia diana mediante la secuencia del sgRNA, posteriormente la nucleasa Cas9 genera un corte de doble cadena que a su vez activa uno de los sistemas de reparación de acuerdo al diseño del sgRNA.

Nucleasa Cas9

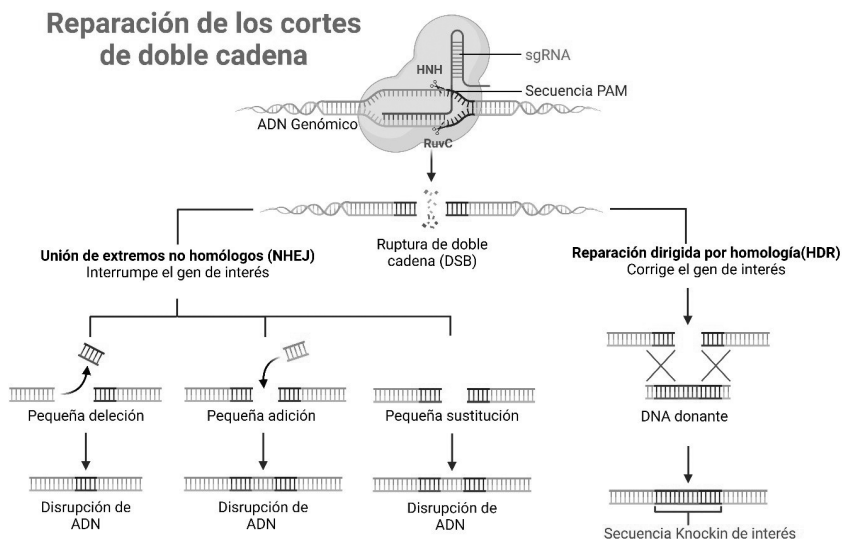
La nucleasa Cas9 se expresa en distintas bacterias, como *Actinomyces naeslundii* (AnaCas9), *Francisella novicida* (FnCas9), *Staphylococcus aureus* (SaCas9) y *Streptococcus pyogenes* (SpyCas9). SpyCas9 es la más utilizada de las nucleasas, es una proteína grande (1368 aminoácidos) y con multidominios. SpyCas9 corta las cadenas del DNA diana a 3 pb río arriba de la secuencia PAM. Posee dos dominios diferentes, el dominio HNH que corta la cadena de DNA complementaria al crRNA o al sgRNA y el dominio RuvC-like que corta la cadena opuesta. Además de su participación dentro del proceso de interferencia de CRISPR, también participa en la maduración del crRNA y la adquisición de espaciadores.

Reparación de los cortes de doble cadena

La generación de cortes de doble cadena en células eucarióticas activa dos sistemas principales para su reparación, estos se activan naturalmente para corregir estos daños que pueden ser fatales para la célula, encontramos:

- ♦ Non-Homologous End Joining (NHEJ), un mecanismo simple que solamente conecta las terminaciones rotas una con otra, al no ser tan específico la unión resultante puede incorporar inserciones o deleciones aleatorias, provocando corrimiento del marco de lectura y con ello la pérdida de función del gen.
- ♦ Homology-Directed Repair (HDR), es un mecanismo que se apoya en un molde de DNA para reconstruir la rotura de doble cadena, su utilidad se basa en que puede ser incorporada una secuencia con la información deseada, generando mutaciones precisas o cambios específicos en la secuencia (véase figura 2).

FIGURA 2. MECANISMO DEL SISTEMA CRISPR/CAS9 TIPO II



El mecanismo básico de este sistema está basado en la generación de roturas de doble cadena, mismas que posteriormente son reparadas por dos mecanismos distintos (NHEJ o HDR), ambos generan cambios en la secuencia original provocando alteraciones en el gen donde se provocó la rotura.

CRISPR de segunda generación, editores de bases y editores por cebador

Los editores de bases utilizan una Cas9 modificada y fusionada con desaminasa, con ella pueden generar mutaciones puntuales específicas en el DNA sin introducir roturas de doble cadena ni depender de la plantilla de DNA donante. Actualmente, existen dos tipos principales de editores de bases: editor de bases de citosina (EBC) y editor de bases de adenina (EBA). Estos dos editores pueden generar las cuatro posibles mutaciones de conversión: C a T, A a G, T a C y G a A. Para EBC y EBA, una Cas9 modificada se une a la cadena de DNA objetivo, lo

que resulta en una desnaturalización parcial de la cadena que contiene el PAM para formar un bucle R, lo que permite que la desaminasa realice la reacción de desaminación en el nucleótido objetivo.

EBC se compone de tres unidades fundamentales: citidina desaminasa, inhibidor de la uracil DNA glicosilasa (IUDG) y una Cas9 parcialmente inactiva (dCas9 o nCas9). El gRNA guía a las variantes de Cas9 para que se dirijan a secuencias específicas donde genera un corte de cadena sencilla en el DNA, mientras que la desaminasa cataliza la reacción de desaminación para iniciar la edición de la citosina, convirtiéndola en uracilo, el par de bases resultante U-G al no coincidir es reparado y sustituido por T-A (véase figura 3, panel a).

Por otra parte, el EBA no requiere la presencia de un IUDG, produce la desaminación de la adenosina generando inosina, que se lee como guanina mediante mecanismos de replicación y transcripción. El par resultante I-T se transforma en I-C, que luego se modifica como un par G-C por los sistemas de reparación (véase figura 3, panel b).

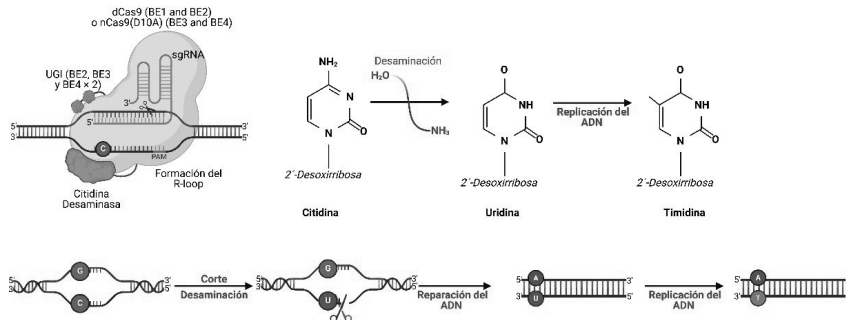
Aunque los editores de bases son eficaces para lograr las cuatro mutaciones de conversión, solamente inducen variantes de un solo nucleótido lo que reduce la especificidad de la edición de genes. En 2019, Liu y colaboradores reportaron el sistema de edición por cebador, que media la inserción dirigida sin introducir roturas de doble cadena.

Los editores por cebador consisten en una nCas9 conectada a una transcriptasa inversa y un sgRNA modificado, llamado RNA guía de edición principal (pegRNA). El pegRNA no solo se une a secuencias de DNA específicas, sino que también contiene una plantilla para sintetizar nuevas cadenas de DNA.

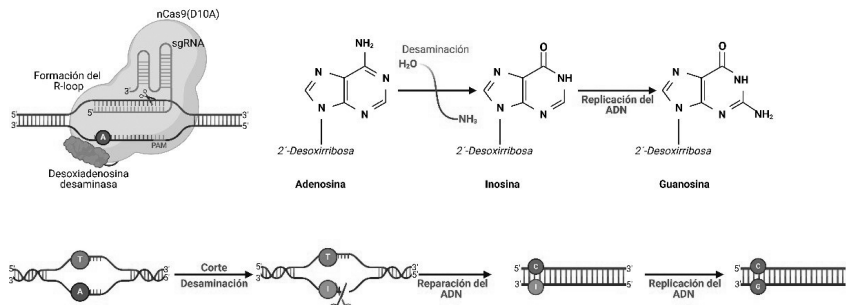
Bajo la guía de pegRNA, el editor se une primero a una secuencia de DNA objetivo y el dominio de nucleasa Cas9 RuvC corta la cadena de DNA que contiene PAM. Para transferir la secuencia editada del pegRNA al DNA objetivo, la transcriptasa inversa lee el RNA y une las bases correspondientes al extremo del DNA cortado, y luego la maquinaria de reparación introduce de manera estable la nueva cadena en el sitio objetivo (véase figura 3, panel c).

FIGURA 3. MECANISMOS DE EDICIÓN

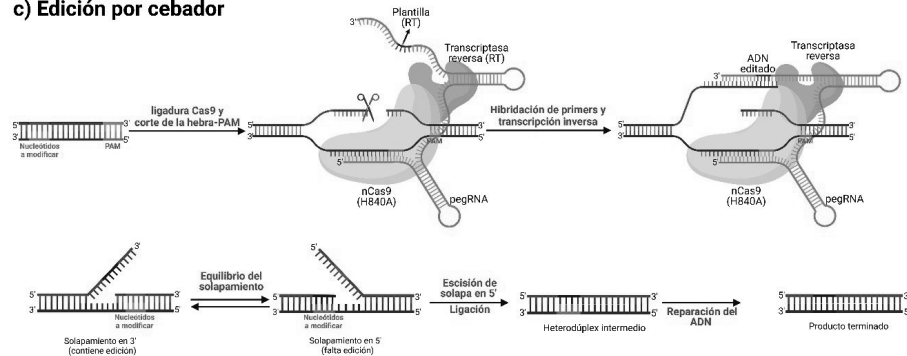
a) Edición de bases de citidina



b) Edición de bases de adenina



c) Edición por cebador



a) Edición de bases de citosina (EBC) la citidina desaminasa cataliza la reacción de desaminación y convierte la citosina en uracilo. Las bases no apareadas U-G resultantes se convierten en T-A después de la replicación o reparación del ADN. b) Edición de bases de adenina (EBA). La desaminación mediada por EBA convierte la adenosina en inosina, que posteriormente se lee como guanina durante la replicación o reparación del ADN. c) Diagrama general de la estructura y mecanismo de edición de los editores por cebador.

Aplicaciones

En la actualidad el sistema CRISPR es considerado una herramienta molecular de edición génica altamente específica con un amplio abanico de aplicaciones, algunos ejemplos son:

- ♦ Edición del epigenoma, como la eliminación de genes marcas genéticas implicadas en la proliferación y supervivencia de las células de cáncer.
- ♦ Lucha contra la infección por virus utilizando un sgRNA específico al genoma viral. Los genes necesarios para el mantenimiento y la replicación viral pueden atacarse inactivando al virus responsable de la infección.
- ♦ Desarrollo de fármacos con la tecnología CRISPR/Cas9. Se desarrollan modelos de enfermedad in vitro donde se pueden testear diversos fármacos a la vez.
- ♦ Generación de organismos genéticamente modificados, mediante el uso de CRISPR/Cas9 es posible realizar modificaciones genéticas tanto en plantas como en animales, por ejemplo, la generación de animales knock out para genes específicos (véase capítulo 8 de esta obra).
- ♦ Inmunoterapia contra el cáncer. La eliminación de receptores inhibidores como PD1 y CTLA-4 mejora significativamente la eficacia de la inmunoterapia contra el cáncer basada en células T. Otra estrategia prometedora es la terapia con células CAR-T.
- ♦ Viroterapia oncolítica. Algunos virus pueden modificarse genéticamente para replicarse eficientemente dentro del huésped, infectar y matar específicamente células cancerosas y posteriormente inducir respuestas inmunes anticancerígenas.

Aplicaciones clínicas

La primera aplicación clínica de CRISPR/Cas9 fue en 2016, donde se administraron células T modificadas a un paciente con cáncer de pulmón avanzado. CRISPR ha demostrado ser una herramienta versátil, ha sido usada en diversas líneas celulares y organismos para editar de manera muy específica uno o varios genes a la vez. En comparación con sus predecesores, como las nucleasas

con dedos de zinc (ZFNs) y las nucleasas efectoras similares a activadores de la transcripción (TALENs) la edición del genoma mediada por CRISPR-Cas9 es más flexible y eficiente debido a su sistema de RNA guía y DNA objetivo.

Sin embargo, su principal aplicación en la clínica no es su uso como terapia génica directa (modificación de genes directamente en el paciente), su aplicación principal es la modificación de células y virus, como la modificación de células T para la mejora de los tratamientos con inmunoterapia celular, como la supresión de inhibidores de células T (PD1 y CTLA4) o la generación de células CAR-T que expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en inglés) en su superficie.

Inmunoterapia contra el cáncer

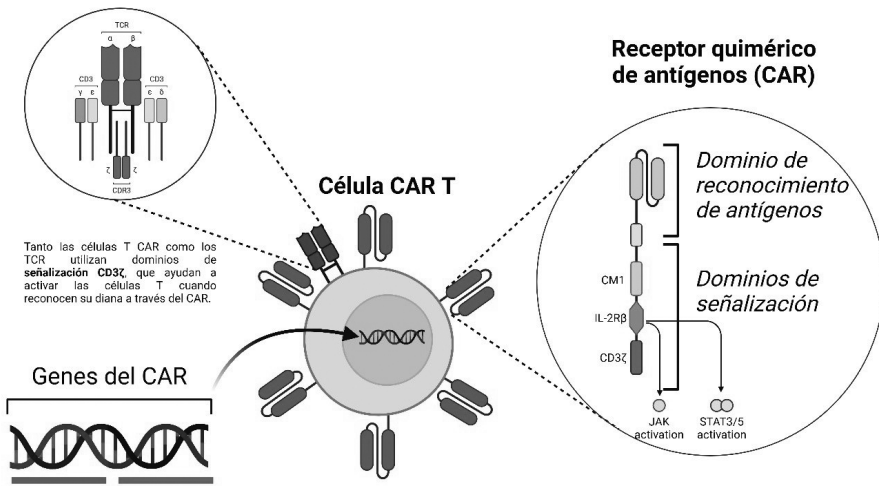
CAR es un receptor generado de una proteína artificial que combina una región de reconocimiento de antígeno, generalmente un anticuerpo monoclonal, con dominios de señalización intracelular de las células T, lo que permite a las células CAR-T identificar y atacar selectivamente las células cancerígenas que expresan el antígeno específico reconocido por el CAR.

El dominio de reconocimiento se selecciona para que se dirija a un antígeno específico y se personaliza según el tipo de cáncer que se desea tratar; esta característica es a su vez la más grande ventaja y desventaja: una ventaja porque hace a la terapia altamente específica lo que hace sumamente eficiente el trabajo de las células T brindando resultados muy efectivos; desventaja dado que al ser un tratamiento tan específico se limita el número de cánceres humanos que pueden ser tratados con el mismo producto, por lo que los protocolos suelen ser personalizados.

Por otra parte, el dominio de señalización intracelular suele ser el mismo en todos los diseños, este dominio es responsable de transmitir señales de activación a las células T una vez que el CAR se une al antígeno en las células cancerosas. Por lo general, consta de uno o más dominios de señalización, como el dominio CD3 ζ de las células T y otros dominios coestimuladores, como el dominio de activación 4-1BB (CD137) o CD28. Estos dominios desencadenan una cascada de señalización intracelular que activa y potencia la respuesta de las células T (véase figura 4).

Además de las modificaciones necesarias para el funcionamiento de CAR, modificaciones extra pueden ser realizadas con la finalidad de aumentar la tasa de éxito de la terapia (CAR-T de tercera generación), una de ellas es la delección de secuencias que codifican para receptores inhibidores en las células T, como PD-1 y CTLA-4.

FIGURA 4. DISEÑO GENERAL DEL RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO (CAR)



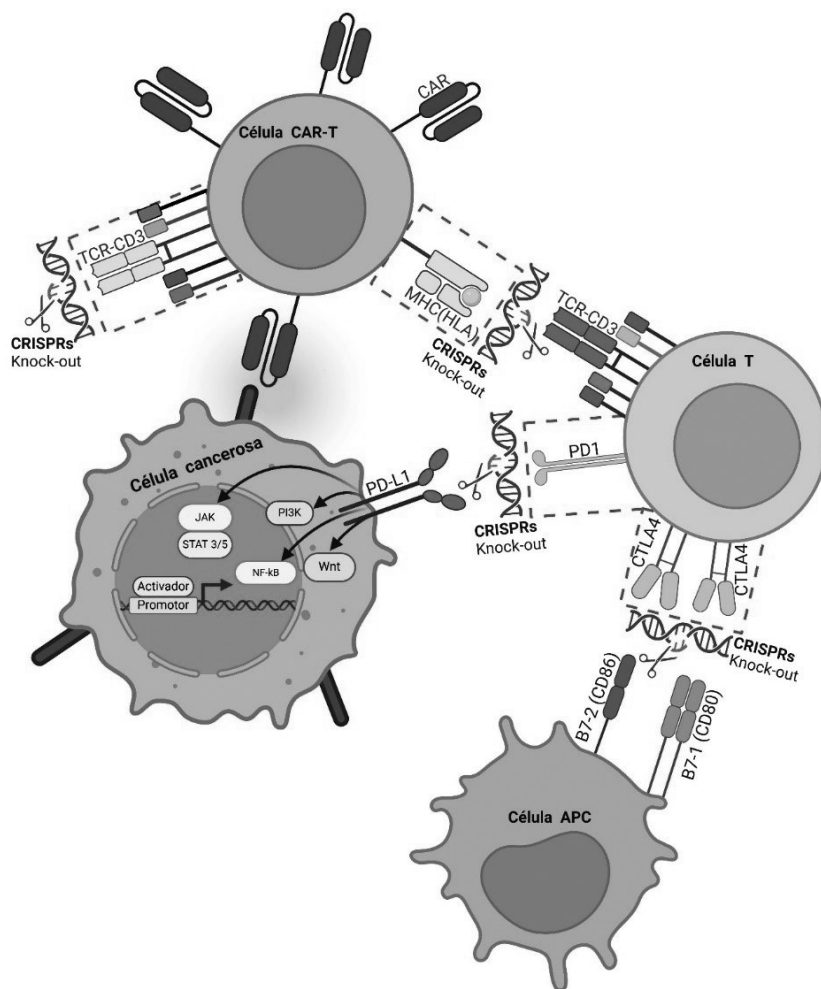
CAR se compone de dos dominios principales, un dominio de reconocimiento de antígenos y un dominio de señalización intracelular, el cual al igual que los TCR presenta al dominio CD3ζ, el cual favorece la activación de las células T.

En el caso de la inmunoterapia con células NK, puede presentarse una resistencia al tratamiento debido a la sobreexpresión de proteínas inhibitorias como PD-L1 (ligando de muerte programada 1), su principal función es interactuar con el receptor PD-1 (muerte programada 1) en la superficie de las células T y las células NK.

Cuando PD-L1 se une a PD-1, se desencadenan señales inhibitorias que disminuyen la actividad citotóxica de las células NK, reduciendo su capacidad para liberar gránulos citotóxicos y citosinas, así como la proliferación de las células T, generando un ambiente inmunosupresor. Además, al interior de la célula tumoral se activan múltiples vías de señalización, como RAS, NF-κB, PI3K-PKB, WNT y Hh, en última instancia, dando lugar a la expresión génica que desarrolla proliferación tumoral y la supervivencia.

Por otra parte, existen modificaciones que permiten plantear el uso de estas terapias de manera alogénica, como la delección de genes relacionados a TCR y HLA, evitando el rechazo inmunológico y facilitando el acceso a la inmunoterapia (véase figura 5).

FIGURA 5. MODIFICACIONES



Se muestran las modificaciones más comunes en las células CAR-T de tercera generación, delección de secuencias inhibitorias de células T, como PD1 y CTLA4, y delección de genes relacionados con el rechazo inmunológico, como TCD-CD3 y HLA.

Viroterapia oncolítica

La terapia oncolítica CRISPR es una estrategia emergente en el tratamiento del cáncer que combina la tecnología CRISPR-Cas9 con virus oncolíticos. Estos virus infectan y destruyen células cancerosas selectivamente, dejando las células normales intactas.

Algunos ejemplos incluyen el virus del herpes simple, el adenovirus, parvovirus H1, y el vaccinia virus. Mediante el sistema CRISPR se puede mejorar su especificidad y eficacia contra células cancerosas o facilitar la susceptibilidad de las células cancerosas al virus oncolítico. Esto se logra mediante la desactivación de genes en células tumorales que confieren resistencia a este tipo de virus o mediante la introducción de genes que aumenten la capacidad del virus para replicarse o evadir el sistema inmunológico del huésped.

La terapia se realiza mediante la administración del virus en el paciente, ya sea directamente en el tumor o de manera sistémica (a través del torrente sanguíneo). El virus infecta preferentemente las células cancerosas y se replica dentro de ellas causando lisis celular y liberando partículas virales que pueden infectar células cancerosas circundantes. A su vez, la destrucción de células cancerosas y la liberación de antígenos tumorales pueden estimular una respuesta inmune contra el tumor.

La seguridad de esta terapia está enfocada en que el virus no cause infecciones dañinas en células normales, además de que exista una entrega eficiente del virus a todas las células tumorales. Sin embargo, debemos tomar en cuenta que el sistema inmune del paciente puede neutralizar el virus antes de que tenga efecto en el tumor, disminuyendo la eficacia.

La terapia oncolítica CRISPR es una herramienta prometedora que se encuentra en fase de investigación y desarrollo. Los estudios preclínicos y clínicos están en curso para evaluar su seguridad y eficacia en diferentes tipos de cáncer.

Al día de la escritura del presente capítulo, cuatro virus oncolíticos y un virus no oncolítico han recibido la aprobación para el tratamiento del cáncer. Entre ellos, el talimogene laherparepvec (T-VEC), un virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) modificado para codificar el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), terapia aprobada para su uso en melanoma metastásico. Su aprobación se debe a que durante un ensayo clínico aleatorizado de fase III demostró una tasa de respuesta duradera mejorada para pacientes con melanoma avanzado.

Enfermedades genéticas

Aunque la versatilidad de los sistemas CRISPR pueden permitir a esta herramienta ser utilizada en la terapia génica en humanos, en la práctica existen muy pocos protocolos clínicos registrados. Un ejemplo es el protocolo registrado en la plataforma clinicaltrials.gov: *CRISPR/Cas9 Instantaneous Gene Editing Therapy to Intraocular Hypertensive POAG With MYOC Mutation*, con número de registro NCT06465537, desarrollado por investigadores del Beijing Tongren Hospital, en Beijing, China.

En este protocolo un sistema CRISPR/Cas9 contenido en un lentivirus de tercera generación sin la capacidad de integrarse, llamado BD113vVLP (partícula similar al virus BD113), es administrado mediante inyección intracameral (dosis única: $4\mu\text{g/p24}$) para cada ojo. Este sistema está dirigido a desactivar el gen de la miociclina mutado (MYOC); comúnmente las mutaciones en este gen causan que la miociclina se acumule en las células de la malla trabecular, una causa común del glaucoma.

Los sistemas CRISPR al igual que las demás herramientas de modificación génica deben ajustarse a las directrices principales de la terapia génica, por ejemplo, debe existir una finalidad médica, se debe limitar al tratamiento de enfermedades graves para las que no exista ningún otro tratamiento eficaz conocido y debe realizarse únicamente en células somáticas, dejando de lado a las células germinales humanas.

Como antecedente tenemos el caso de He Jiankui, quien en 2018 alteró el genoma de los embriones de siete parejas durante los tratamientos de fertilidad. Su objetivo era introducir un polimorfismo en el receptor CCR5 inhabilitándolo, lo que impide que el VIH infecte a los glóbulos blancos.

El proyecto clínico se llevó a cabo en secreto en el Southern University of Science and Technology (SUSTech) en Shenzhen, China, hasta el 25 de noviembre de 2018, cuando el MIT Technology Review publicó la historia del experimento. He Jiankui, inmediatamente anunció el nacimiento de los bebés con genoma editado en una serie de cinco videos de YouTube el mismo día.

Los primeros bebés en nacer, conocidos por sus seudónimos Lulu (chino: 露露) y Nana (娜娜), son gemelas nacidas en octubre de 2018, y el segundo nacimiento (tercer bebé) se dio en 2019, conocido con el seudónimo Amy.

Esta situación provocó que, en diciembre de 2019, He Jiankui fuera condenado por un tribunal chino, por haber violado deliberadamente las normas médicas, y fue sentenciado a 3 años en prisión y una multa de tres millones de yuanes (430.000 dólares).

Sistema *very fast* CRISPR (vfCRISPR)

El sistema vfCRISPR permite la edición del genoma bajo demanda, mediante la inducción sincronizada de una rotura de doble hebra (DSB) activada por luz. El principio de diseño de vfCRISPR se basa en el mecanismo de escisión de *Streptococcus pyogenes* Cas9. En el mecanismo silvestre el motivo adyacente al protoespaciador (PAM) región de 9 a 10 pb que se encuentran de manera proximal al RNA guía (gRNA), lidera la unión de Cas9 a su DNA objetivo. Sin embargo, para activar la escisión es necesario un emparejamiento de bases adicional en la región distal de PAM (10 a 20 pb).

En vfCRISPR se reemplazan dos o tres uracilos en la región distal PAM del crRNA con nucleótidos “enjaulados” de timina sensibles a la luz (nucleótidos modificados con 6-nitropiperoniloximetilo). Esto genera un sgRNA enjaulado (csgRNA), cuando este hibrida con el tracrRNA genera un complejo Cas9/csgRNA capaz de unirse a su DNA objetivo, pero que no puede escindir el DNA dado el impedimento estérico impuesto por los grupos enjaulados, que impiden que el DNA se desenrolle adecuadamente y con ello la activación de Cas9. Tras la estimulación luminosa a 365 o 405 nm, los grupos enjaulados se eliminan y el complejo ahora activado escinde rápidamente el DNA objetivo.

Estudios en células de un riñón embrionario humano encontraron en vfCRISPR una eficiencia en la generación de inserciones y deleciones de hasta el 97%. Además, las células expuestas a esta dosis de luz no mostraron fototoxicidad aparente y aproximadamente el 50% de la escisión del DNA se encontró dentro de los 30 segundos posteriores a la activación de la luz. En comparación con otros métodos de inducción de Cas9, vfCRISPR muestra una cinética de escisión mucho más rápida y una mayor eficiencia de escisión.

Conclusiones

A pesar de los avances generados en los protocolos clínicos donde se utiliza CRISPR, aún existen aplicaciones de esta herramienta con un largo camino por delante, por ejemplo, el uso directo en pacientes humanos para atacar genes relacionados con el cáncer o para la inserción de SNPs con ventaja terapéutica.

Una de las principales preocupaciones es la bioseguridad del sistema, por ejemplo, el riesgo de que las modificaciones se generen fuera de la secuencia objetivo y pueda generarse una oncogenicidad inducida, lo cual se puede disminuir a través de mejoras en la especificidad del sistema o en procesos de selección de las células modificadas exitosamente.

De la misma manera existe el riesgo de generar una respuesta inmune exacerbada del huésped inducida por los componentes CRISPR/Cas. Sin embargo, a pesar de sus desventajas, actualmente el sistema CRISPR/Cas9 es la herramienta de edición génica más utilizada.

Referencias

- Chen, M., Mao, A., Xu, M., Weng, Q., Mao, J. y Ji, J. (2019). CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges. *Cancer letters*, 447, 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.017>
- Jiang, F. y Doudna, J. A. (2017). CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual review of biophysics*, 46, 505-529. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
- Kaufman, H. L., Kohlhaup, F. J. y Zloza, A. (2015). Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nature reviews. Drug discovery*, 14(9), 642-662. <https://doi.org/10.1038/nrd4663>
- Wang, S. W., Gao, C., Zheng, Y. M., Yi, L., Lu, J. C., Huang, X. Y., Cai, J. B., Zhang, P. F., Cui, Y. H. y Ke, A. W. (2022). Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer. *Molecular cancer*, 21(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01518-8>
- Liu, Y., Zou, R. S., He, S., Nihongaki, Y., Li, X., Razavi, S., Wu, B. y Ha, T. (2020). Very fast CRISPR on demand. *Science*, 368(6496), 1265-1269. <https://doi.org/10.1126/science.aay8204>

- Liu, Z., Shi, M., Ren, Y., Xu, H., Weng, S., Ning, W., Ge, X., Liu, L., Guo, C., Duo, M., Li, L., Li, J. y Han, X. (2023). Recent advances and applications of CRISPR-Cas9 in cancer immunotherapy. *Molecular cancer*, 22(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01738-6>
- Wu, S. Y., Fu, T., Jiang, Y. Z. y Shao, Z. M. (2020). Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Molecular cancer*, 19(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01238-x>

Semblanzas

Adriana María Salazar Montes

Doctora en Biología Molecular, Instituto de Investigación en Enfermedades Crónico Degenerativas, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Alejandra Natali Vega Magaña

Doctora en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas, Departamento de Clínicas Médicas, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Alejandro Arellano Pérez

Médico especialista en Ginecología y Medicina Materno Infantil, Centro Universitario de Tonalá de la Universidad de Guadalajara.

Alberto Gutiérrez Becerra

Doctor en Ciencias en Ingeniería Química. Departamento de Ciencias Básicas y Aplicadas, Centro Universitaria de Tonalá de la Universidad de Guadalajara.

Andrés López Quintero

Doctor en Genética Humana, Instituto de Nutrigenética y Nutrigenómica Traslacional, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Belinda Vargas Guerrero

Doctora en Biología Molecular, Instituto de Investigación en Enfermedades Crónico Degenerativas, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Carmen Magdalena Gurrola Díaz

Doctora en Biología Molecular, Instituto de Investigación en Enfermedades Crónico Degenerativas, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Eber Josué Carrillo Martínez

Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica, Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

Erika Martínez López

Doctora en Biología Molecular en Medicina, Instituto de Nutrigenética y Nutrigenómica Traslacional, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Estefanía Domínguez Fonseca

Ingeniera en Nanotecnología. Departamento de Ciencias Básicas y Aplicadas, Centro Universitaria de Tonalá de la Universidad de Guadalajara.

Edgar Benjamín Figueroa Ochoa

Doctor en Ciencias en Ingeniería Química. Departamento de Bioquímica, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería de la Universidad de Guadalajara.

Eva Solís Sta

Médico cirujano y partero, Instituto de Investigación en Enfermedades Crónico Degenerativas, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud Universidad de Guadalajara.

Fabiola Solórzano Ibarra

Doctora en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigación en Enfermedades Crónico Degenerativas, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Francisco Antonio Guillermo Mateos Ramírez

Químico fármaco-biólogo, Instituto de Investigación en Enfermedades Crónico Degenerativas, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Griselda Hernández Tapia

Ingeniero Biotecnológico, Instituto de Investigación en Enfermedades Crónico Degenerativas, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Héctor Fabián Nario Chaidez

Médico especialista en Geriátría y Gerontología, CBCells, Sistemas y Servicios Oncológicos de Latinoamérica S.A. de C.V.

Itzae Adonai Gutiérrez Hurtado

Doctor en Genética Humana, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Jesús Fernando Guerrero Rodríguez

Doctor en Biología Molecular en Medicina, Unidad Académica de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Zacatecas.

Jorge Adrián Ramírez de Arellano Sánchez

Doctor en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Jorge Hernández Bello

Doctor en Genética Humana, Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas, Departamento de Clínicas Médicas, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Jorge Ramón Padilla Gutiérrez

Doctor en Genética Humana, profesor investigador, Instituto de ciencias biomédica, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Jorge Vergara Galicia

Doctor en Farmacia, Departamento de Ciencias de la Salud-Enfermedad como Proceso Individual, Centro Universitario de Tonalá de la Universidad de Guadalajara.

José Alonso Aguilar Velázquez

Doctor en Genética Humana, Laboratorio de Ciencias Morfológico Forenses y Medicina Molecular, Departamento de Morfología, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

José María Vera Cruz

Doctor en Biología Molecular en Medicina, Instituto de Nutrigenética y Nutrigenómica Traslacional, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

José Miguel Moreno Ortiz

Doctor en Genética Humana, Instituto de Genética Humana “Dr. Enrique Corona Rivera”, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

José Villanueva Torres

Médico Especialista Oftalmólogo, Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Lourdes Mónica Bravo Anaya

Doctora en Ciencias en Ingeniería Química y doctora en Mecánica de Fluidos, Procesos y Energía. Institut des Sciences Chimiques de Rennes, Campus de Beaulieu, Université de Rennes Cedex.

Luis Daniel Hernández Ortega

Doctor en Biología Molecular en Medicina, Centro de Investigación Multidisciplinaria en Salud, Departamento de Ciencias Biomédicas, Centro Universitario de Tonalá de la Universidad de Guadalajara.

Mariana Saraí Pérez Robles

Doctora en Biología Molecular en Medicina, Instituto de Nutrigenética y Nutrigenómica traslacional, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Nadia Tatiana García Barrientos

Doctora en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigación en Enfermedades Crónico Degenerativas, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Paloma Lucía Guerra Ávila

Doctora en Biología Molecular en Medicina, profesor investigador, Instituto de Investigación en Enfermedades Crónico Degenerativas, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Raúl Cuauhtémoc Baptista Rosas

Doctor en Ciencias en Ecología Molecular y Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Salud- Enfermedad como Proceso Individual, Centro Universitario de Tonalá de la Universidad de Guadalajara. Coordinación de Investigación Hospital General de Occidente, Secretaría de Salud Jalisco.

Scarlett Elizabeth López Álvarez

Maestra en Ciencias de Materiales. Centro de Investigación en Biomateriales, Departamento de Madera, Celulosa y Papel, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería de la Universidad de Guadalajara.

Susana del Toro Arreola

Doctora en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigación en Enfermedades Crónico Degenerativas, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Wendy Yareni Campos Pérez

Doctora en Biología Molecular en Medicina, Instituto de Nutrigenética y Nutrigenómica Traslacional, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Yeminia Maribel Valle Delgadillo

Doctor en Genética Humana, profesor investigador, Instituto de Ciencias biomédicas, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

Gerencia editorial

Sol Ortega Ruelas

Cuidado de la edición

Mariana Hernández Alvarado

Diseño de portada

Pablo Ulises Ontiveros Pimienta

Maquetación

Maritzel Aguayo Robles

Medicina genómica. Un camino hacia la medicina personalizada

se terminó de imprimir en noviembre de 2024
en Guadalajara, Jalisco, México.

Para su composición se utilizaron las tipografías **Fira Sans** y **Andada Pro**.