

Células en cultivo mostrando el citoesqueleto de actina

De Moléculas y Parásitos

Aunque importantes esfuerzos multilaterales se han puesto en marcha, las enfermedades tropicales siguen siendo un flagelo para los países pobres. Con el *boom* de la genómica, los enfoques tradicionales en investigación, prevención y control han sido complementados con nuevas aproximaciones desde la biología molecular, la bioinformática y la ingeniería genética. Todos estos estudios anhelan encontrar una cura. En la Universidad de Antioquia las enfermedades tropicales van al laboratorio.

Enfermedad de Chagas al laboratorio: parásitos que se resisten a morir

“Laura, que si usted le puede mostrar un trypanosoma bien agresivo a esta muchacha. El más patógeno que tenga para que lo vea en el microscopio invertido”, le dice el investigador Omar Triana, del grupo de investigación Biología y Control de Enfermedades Infecciosas, a una de sus estudiantes. Juntas, vamos a un pequeño cuarto de cultivo donde todos los parásitos “duermen” dentro de una incubadora en tubitos debidamente marcados.

Me aísla los zapatos con unas fundas de tela, me pone guantes de latex y me dice: “No toques nada”. Una vez adentro, saca un tubito de la incubadora, extrae algo, lo pone en un vidrio, lo monta al microscopio, mira, enfoca y me dice: “Este es”.

Y ahí está él. Pequeño organismo unicelular con cola llamado *Trypanosoma cruzi*, famoso por causar la enfermedad de Chagas, una “epidemia silenciosa” propia del continente americano, que afecta principalmente a las comunidades con bajas condiciones socioeconómicas y que ahora se expande por todo el mundo.

Actualmente la enfermedad se trata con dos fármacos

que tienen más de cuarenta años, alto grado de toxicidad y una eficacia que no llega al 100%. Por eso para el doctor Triana “la meta es conocer todo el genoma del parásito y así poder diseñar nuevos medicamentos”.

En el fondo de la incubadora de aquel cuarto de cultivo está uno de los tubitos más queridos en el laboratorio. Tiene trypanosomas aislados de un niño de tres años que no se curaba con el medicamento actual. La muestra fue enviada por el Instituto Nacional de Salud para que el grupo la estudiara y lo que encontraron fue que los parásitos de esta cepa eran resistentes al tratamiento.

Del pequeño no se volvió a saber nada. En Bogotá perdieron el rastro. “Con Chagas pasa mucho eso, como afecta tanto a personas del campo, a veces se desplazan o no vuelven a los controles y es difícil hacerles un seguimiento”, cuenta el investigador.

Los experimentos para evaluar la resistencia del trypanosoma a un fármaco se basan en comparar. El biólogo va al cuarto de cultivo y toma dos tubitos: en uno está el parásito resistente, que no muere con el medicamento, y en el otro está el que sí lo hace.

Para comenzar debe cultivar ambos y dejarlos reproducir por siete días hasta obtener mil millones de

cada uno. Luego los hace nadar en el medicamento y, por último, compara todos los genes que se expresan en ambos. Si ve que en el resistente hay un gen diferente, lo coge, se lo inserta al parásito que sí se muere y evalúa qué pasa.

“Los genes que encontramos diferentes los comparamos con las bases de datos libres de Internet y miramos cuáles han estado relacionados con resistencias. Hemos seleccionado veinte que sí están involucrados. Estos son nuestros candidatos para seguirlos estudiando”.

Otro experimento del mismo grupo de investigación lo lleva a cabo la doctora Ana María Mejía. Consiste en volver resistente a un parásito que no lo era. Se toman unos pocos trypanosomas y se hacen nadar en medicamento. Muchos se mueren y los pocos que quedan vivos se dejan crecer nuevamente. Luego se les pone más medicamento y así sucesivamente. Se comparan los genes que se expresan en cada uno. “Encontramos un gen que estaba mutado en el resistente. Entonces cogimos los parásitos sensibles, que sí se mueren, les metimos el gen con la mutación y se volvieron resistentes”.

“Esto de conocer el genoma y cómo se expresan los genes en cada tipo de trypanosoma está en mucho furor ahora —dice el doctor Triana—. Los primeros blancos de medicamentos serían aquellas sustancias vitales para la supervivencia del causante de la enfermedad. Además, conocer el genoma es importante para saber exactamente qué tienen de diferente el trypanosoma y el humano”.

Leishmaniasis al laboratorio: experimentos químicos virtuales

Cuando uno entra al laboratorio del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) ve moléculas flotando en los descansadores de pantalla de los computadores. Mientras sus dueños toman tinto, leen o realizan experimentos las máquinas buscan medicamentos para la leishmaniasis.

Esta iniciativa es una de las tantas que ha emprendido el doctor Carlos Muskus, coordinador de la Unidad de Biología Molecular y Computacional del PECET, en colaboración con un grupo de investigadores y de la mano de la biología computacional. El objetivo es encontrar sustancias que destruyan el

parásito causante de esta enfermedad tropical que afecta a personas de muchas partes del mundo.

Desde la Universidad de Texas, en una pequeña isla del Golfo de México, el doctor Stanley Watowich un día le escribe diciéndole: “Carlos, ustedes andan buscando un medicamento contra la leishmaniasis. Yo tengo un proyecto de búsqueda de fármacos para dengue y lo estoy corriendo en una plataforma computacional de IBM”.

Mientras el doctor Muskus cuenta la historia, la barra de progreso en su pantalla muestra que el estado de una operación alcanza el 84%. Toca el ratón y el computador reanuda sus funciones. “Por ejemplo, mientras yo estoy hablando aquí contigo mi computador está trabajando en los datos. Cuando detecta que está inactivo comienza a procesar y cuando completa el 100% de un cálculo manda el resultado a Estados Unidos. Luego nos los hacen llegar a nosotros junto con los resultados de procesos en computadores de todo el mundo”.

La tarea de IBM ha sido convencer a personas de todo el mundo para que donen el tiempo ocioso de sus computadores. Los datos de las dos millones de máquinas que están conectadas son recogidos en un servidor para luego ser mandados a cada grupo de investigación.

Lo que el profesor hace, en colaboración con otras personas del PECET, es realizar experimentos virtuales. Consisten en mirar cómo interaccionan dos moléculas en un espacio tridimensional y virtual. Hace parte de lo que se conoce como búsqueda racional de fármacos (ver recuadro abajo), es decir, encontrar qué molécula, en este caso un medicamento, se acopla con alta afinidad a otra, por ejemplo a una proteína vital para el parásito.

“Con la plataforma de IBM estamos ensayando 600.000 medicamentos contra 530 moléculas del parásito. Si multiplicas eso te da un número gigante para procesar computacionalmente. Para hacerlo en un clúster con buena capacidad me demoraría por lo menos veinte o treinta años”. Con esta plataforma la parte computacional de la investigación se demorará aproximadamente dos años.

El proceso de búsqueda de medicamentos se ha ido transformando desde que empezó el *boom* de



la genómica, pero sobre todo desde que los datos moleculares se fueron haciendo públicos en Internet.

El PECET viene trabajando hace muchos años en encontrar tratamientos para la leishmaniasis. Inicialmente se hacía solo a través de los remedios tradicionales que emplean los afectados en zonas propias de la enfermedad. Por ejemplo, un emplastro de determinada hoja o ponerse calor.

Con grupos de la Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia se preparaban extractos de bejucos, plantas o tallos y se evaluaban. A los que mostraban actividad se les buscaba cuáles eran las moléculas que mataban al parásito. En algunos casos también se evaluaban moléculas que se construían en laboratorios.

Así que, en un principio, se buscaban medicamentos en la naturaleza, luego experimentando en el laboratorio de química y ahora a través de simulaciones virtuales. Con las nuevas técnicas de la biología computacional, el profesor Muskus puede hacer en un año lo que antes le hubiera tomado muchos.

Y entonces, en estos nuevos tiempos, ¿qué hace el investigador mientras el computador piensa?

Todos los científicos están de acuerdo con lo mismo: la parte experimental sigue siendo más vigente que nunca. Lo que las máquinas predigan hay que probarlo luego en el laboratorio. Como el doctor Muskus explica, “si yo me pusiera a hacer experimentalmente pruebas para mirar cuál de los 600.000 medicamentos mata al parásito eso sería un trabajo descomunal. Con los métodos computacionales podemos decir: estos veinte son los más prometedores. Eso me ahorra tiempo y dinero”.

Con los seleccionados, primero se hacen pruebas *in vitro* en cultivos de parásitos. Si se encuentra algún medicamento promisorio, entonces se pasa a la fase de pruebas con animales, donde se infectan, se espera a que desarrollen la enfermedad y, posteriormente, se les trata con el medicamento para ver si se curan o no. Si el compuesto pasa esta etapa estaría listo para ser evaluado en la fase con humanos, buscar su aprobación por la Food and Drug Administration (FDA) y finalmente comercializarse.

También han llegado métodos más automatizados para hacer las pruebas *in vitro*. Cada molécula que

sea un potencial medicamento, sea extraída de planta, construida en laboratorio o predicha computacionalmente, se prueba con el parásito para ver si lo mata o no. Anteriormente era una persona la que contaba en el microscopio cuántas células estaban vivas y cuántos parásitos tenían por dentro. Si el medicamento funcionaba, uno debía ver que el número de parásitos disminuía.

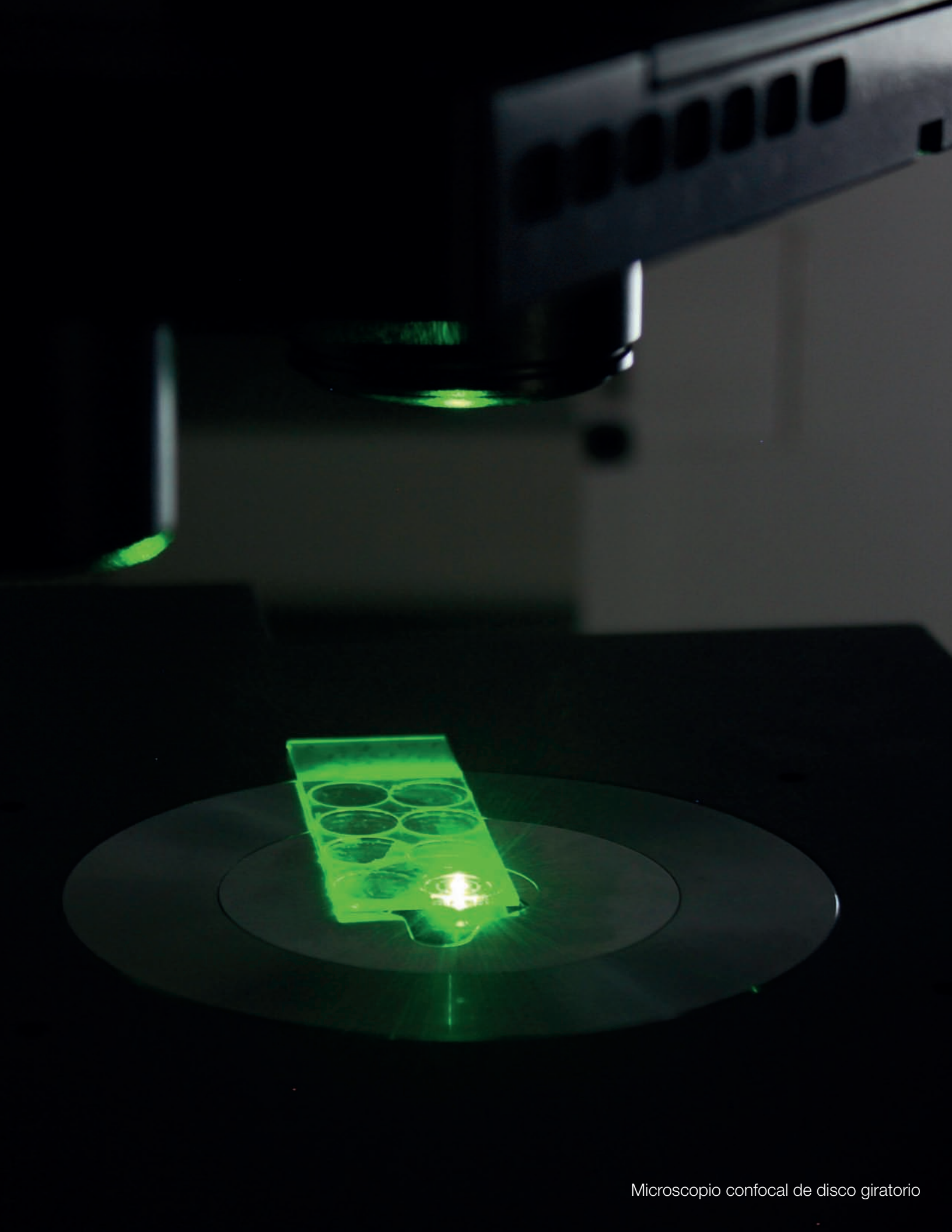
Con técnicas de biología molecular se generan parásitos fluorescentes y quien lee es una máquina y no una persona. Si el medicamento está haciendo efecto sobre el parásito, lo mata y la fluorescencia disminuye y si no está haciendo nada, el parásito se sigue multiplicando y la fluorescencia se incrementa. En el PECET las esperanzas son altas: “Nosotros no somos los más expertos buscando medicamentos pero arrancamos. Es claro que las multinacionales que tienen todo el dinero del mundo se pueden demorar menos. Pero como va la cosa yo creo que vamos a encontrarlos pronto. Podría asegurar que el trabajo que hemos hecho aquí con el parásito de la leishmaniasis y la biología computacional, en lo relacionado con la búsqueda de medicamentos, no lo ha hecho ningún otro laboratorio del mundo”, afirma el doctor Muskus.

Y concluye: “La responsabilidad de la búsqueda de medicamentos, al menos para enfermedades olvidadas como la leishmaniasis, es de los grupos que trabajamos en eso. Los principales países donde se da esta enfermedad son pobres y las compañías farmacéuticas no están muy interesadas porque probablemente no tendrán un mercado atractivo”.

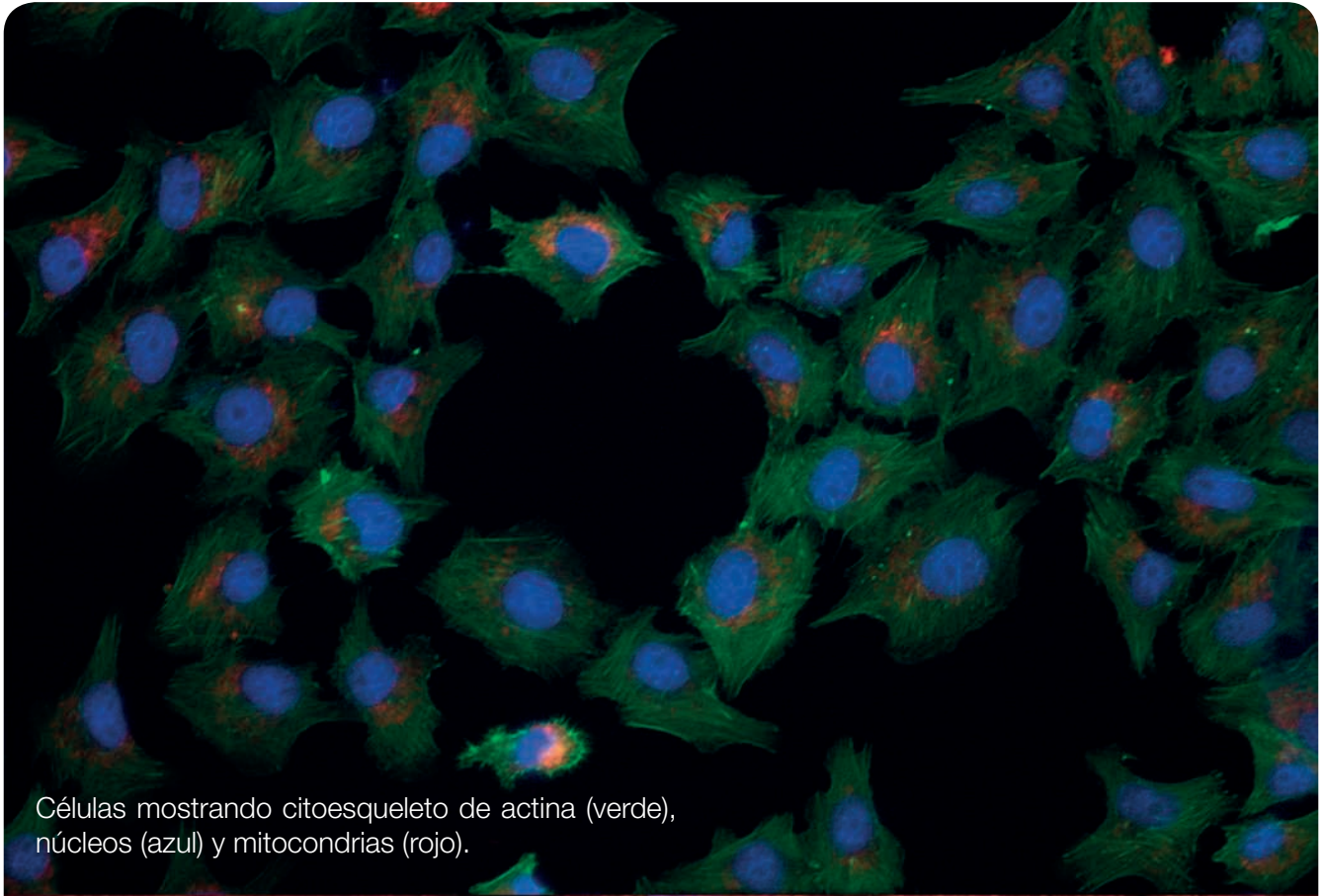
Dengue al laboratorio: en la intimidad del virus

Los virus son entidades, bastante extrañas, porque sin ser organismos vivos tienen varias propiedades vitales. Son pequeños fragmentos de material genético envueltos en una cápsula de proteína que están en la naturaleza buscando organismos vivos donde reproducirse.

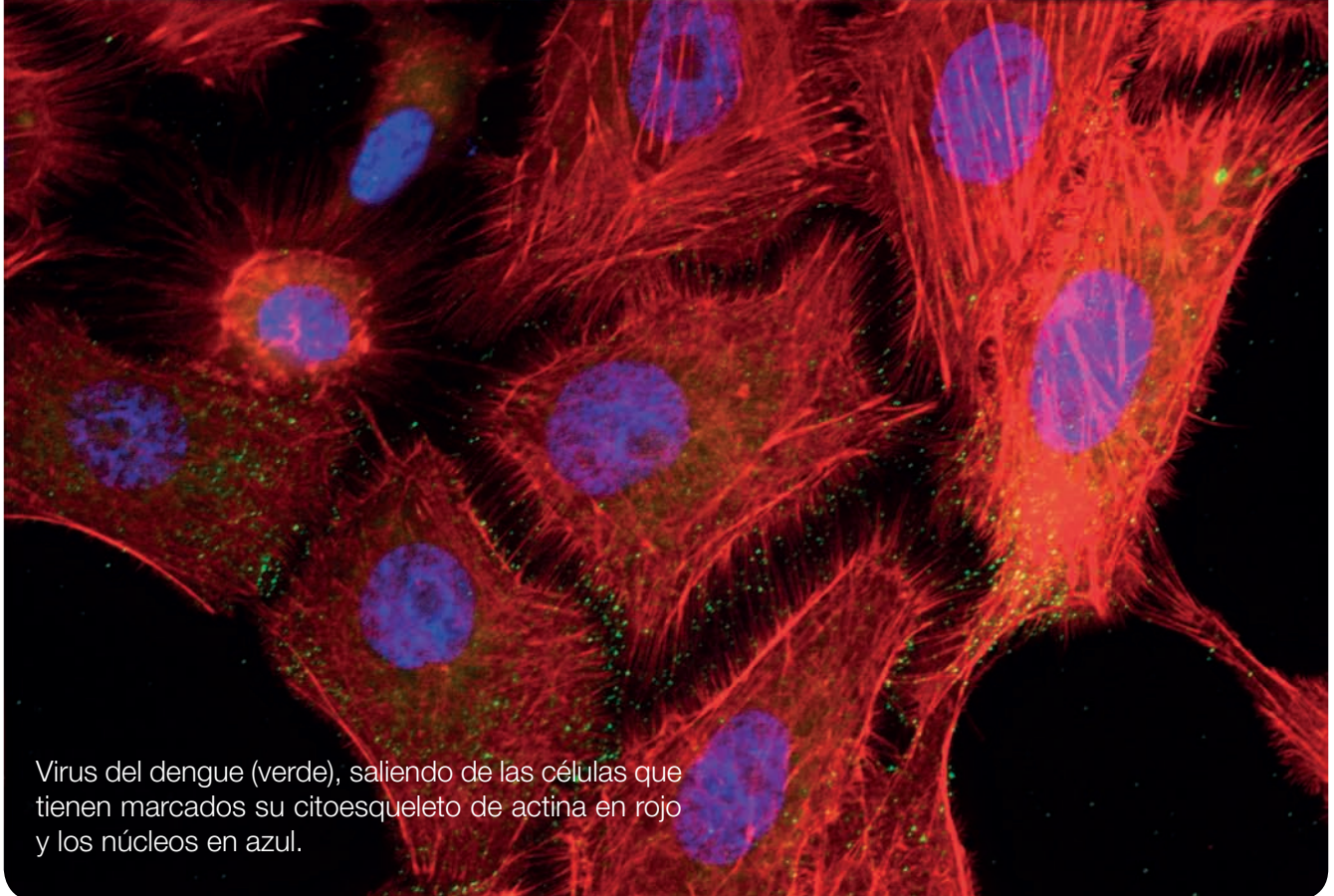
Hace doscientos años ya estaban en las selvas tropicales y hoy en día se multiplican y reconvierten a un ritmo vertiginoso. Esto se ha hecho evidente en el laboratorio del doctor Juan Carlos Gallego, coordinador del grupo de Medicina Molecular y de Traducción: “Los trópicos podrían ser considerados como los laboratorios evolutivos del mundo, y de forma experimental hemos sido testigos de la rápida diversificación del virus dengue a nivel local”.



Microscopio confocal de disco giratorio



Células mostrando citoesqueleto de actina (verde), núcleos (azul) y mitocondrias (rojo).



Virus del dengue (verde), saliendo de las células que tienen marcados su citoesqueleto de actina en rojo y los núcleos en azul.

Y continúa, “son como piratas moleculares capaces de subvertir los procesos y funciones celulares. Sin ser detectados se camuflan y secuestran todo de una manera que nos hace muy difícil controlarlos”.

Y es precisamente un virus el causante de una de las enfermedades tropicales más extendidas en el mundo: el dengue. El control de esta enfermedad se ve desafiado por la falta de terapias eficaces, vacunas y servicios de diagnóstico y tratamiento. A pesar de años de estudio, incluso sus mecanismos patogénicos son poco conocidos.

Para el doctor Gallego el éxito del estudio de las enfermedades tropicales, desde la biología molecular y la ingeniería genética, depende de hacer una buena “medicina de traslación”, es decir, pensar en el paciente desde el momento mismo en que se diseña el experimento.

Ir de la mesa del laboratorio a la cabecera de la cama del enfermo, por ejemplo, en el caso del dengue, requiere de un conocimiento muy exhaustivo del virus y de sus mecanismos de acción dentro de los humanos.

Para este entendimiento, en el laboratorio se desarrollan células manipuladas genéticamente, que tienen compartimentos fluorescentes por la introducción de genes de otros organismos, como las medusas y las anémonas de mar.

“Para lograr presenciar el proceso de la infección viral dentro de la célula hospedera, además de contar con células fluorescentes, se requiere tener un virus que también lo sea, razón por la cual hace años nos embarcamos en la tarea de construir un clon infeccioso del virus Dengue”, cuenta el investigador.

Este conocimiento también se usa para la construcción de terapias genéticas, empleando los virus como especie de carrito que lleva la información hacia el interior del organismo. “En esencia se trata de manipular los virus por ingeniería genética haciéndolos inoocuos mediante la eliminación de los “genes malos” pero insertándoles mensajes genéticos que hagan una función benéfica dentro de las células y animales”.

En un pequeño cuarto oscuro varios estudiantes se agolpan alrededor de una pantalla conectada a un potente microscopio. En silencio todos observan explosiones de virus fluorescentes mientras el pro-

fesor Gallego les recuerda que lo más importante es hacer investigación molecular con pertinencia social.

El objetivo es hacer de las ciencias básicas una herramienta para la solución de problemas sociales y no distraerse con las quimeras de la ciencia ficción. En varios laboratorios de la Sede de Investigación Universitaria (SIU) se hacen experimentos moleculares para encontrar algún día la cura a algunas de las enfermedades tropicales. ¿Será posible en un país con la ciencia de Colombia?

Ante esta inquietud el doctor Triana habla de la diferencia entre un laboratorio de aquí y uno de Estados Unidos:

“Lo único distinto es la burocracia. Por ejemplo, mandar a secuenciar en Colombia (léase: descifrar la información genética) nos costó ochenta millones y allá nos hubiera valido treinta. Pero lo hacemos acá porque la idea nuestra es apoyar el despegue del Centro Nacional de Secuenciación Genómica de la Universidad de Antioquia. El problema es que si yo necesito un kit para extraer ADN y lo mando a traer se me demora uno o hasta dos meses. En Estados Unidos lo pides y te llega por la tarde. A veces los equipos de laboratorio se demoran hasta dos semanas en la aduana. Nosotros tenemos todo para hacerlo pero nos demoraremos más”.

El tiempo ganado con la biología computacional lo estamos perdiendo en tramitología. Esto hará más lenta la investigación a menos que diferentes sectores sociales y económicos se unan por la misma causa: no sólo erradicar los parásitos sino también los otros males que aquejan la investigación.

El boom de la genómica

En el año 2000 fue publicado un borrador inicial del genoma humano, y en abril de 2003 el expresidente Bill Clinton anunció al mundo que estaba completo. Luego de algunas batallas jurídicas la información fue liberada en Internet para que todos los investigadores accedieran a ella gratuitamente.

El concepto de ciencias “ómicas” recoge aquellas disciplinas como la genómica, la proteómica, la transcriptómica y la metabolómica. Tienen en común que se basan en el análisis de un gran volumen de datos, por lo que el uso de la computación científica es indispensable.

Con las técnicas moleculares se buscan genes y/o proteínas vitales para la supervivencia del parásito o para su resistencia a medicamentos. Estos hallazgos son las claves para el desarrollo de nuevos fármacos.

1. Cultivo masivo de parásitos



Leishmania
(Enfermedad: Leishmaniasis)



Trypanosoma cruzi
(Enfermedad de Chagas)



Plasmodium
(Enfermedad: Malaria)

Genómica

2. Extracción de ADN

Transcriptómica

2. Extracción de ARN

Proteómica

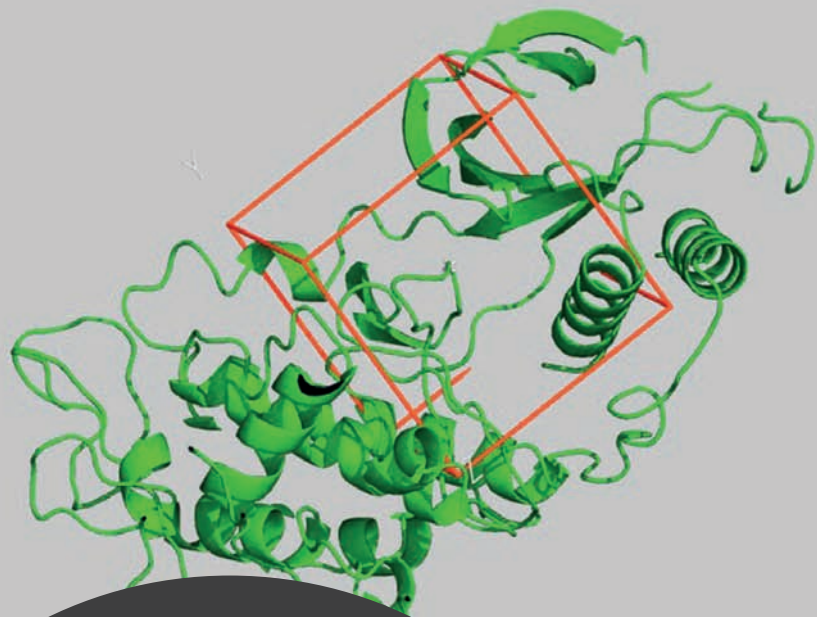
2. Extracción de proteínas



3. Análisis de cómo se expresan en cada metodología los genes que están siendo estudiados

4. Desarrollo de fármacos a partir de blancos moleculares

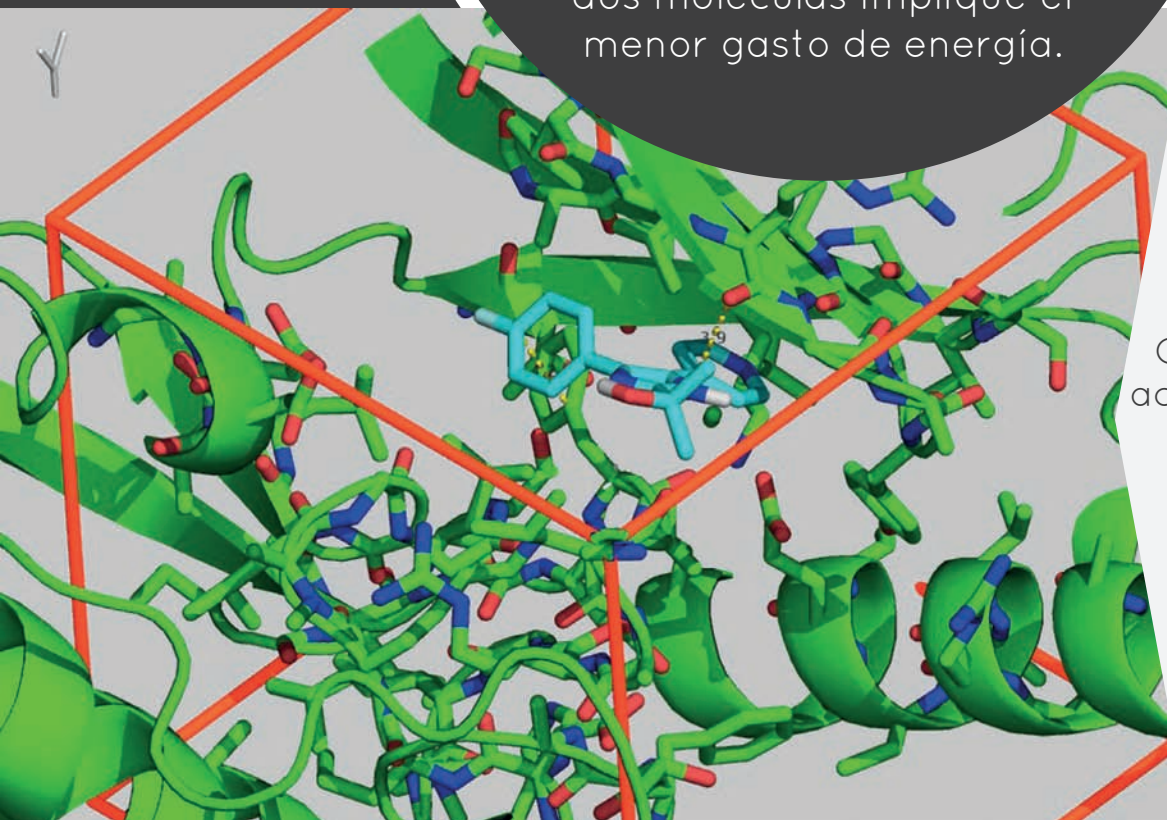
Proteína receptora (verde)
y área (cubo) donde
buscará acoplarse el
compuesto que se está
probando



**Acoplamiento
molecular entre una
proteína vital para el
parásito y un compuesto
que está siendo probado
para el tratamiento de la
enfermedad.**

A través de la simulación por
computador se buscan acoples de
alta afinidad donde la unión de
dos moléculas implique el
menor gasto de energía.

Compuesto (azul claro)
acoplado a la proteína del
parásito



Con la genómica entendemos el conjunto completo de genes de un organismo. Con la transcriptómica conocemos cuáles de estos genes efectivamente se expresan en el individuo, debido a que parte del material genético se queda en silencio. Gracias a la proteómica indagamos qué gen se transforma en qué proteína.

GLOSARIO

Cepa: conjunto de microorganismos, presentes en un cultivo o en una colonia, que proceden de un único individuo inicial.

Molécula: parte más pequeña de una sustancia pura que conserva íntegramente las propiedades de dicha sustancia.

Diseño racional de fármacos

El método histórico de descubrimiento de medicamentos se basa en el ensayo y error, probando sustancias químicas en animales y comparando sus efectos. El diseño racional, por su parte, necesita de un profundo conocimiento de los mecanismos moleculares de la enfermedad.

Es como si miráramos la Tierra primero desde el espacio y observáramos grandes masas de continentes. Nos acercáramos un poco y pudiéramos describir cordilleras y lagos. Entrando más veríamos grandes construcciones, como las pirámides o la Gran Muralla China. Si solo conociéramos hasta ahí, ¿cómo haríamos para que una carta llegara a la puerta de nuestra casa? Quizás enviaríamos miles que caerían sobre todo el Valle de Aburrá para que alguna de ellas llegara a casa pero no podríamos evitar que alcanzara también al resto de la ciudad. Con los nuevos acercamientos de *Google maps* nos sorprendemos viendo calles, parques y hasta nuestra propia puerta. Cuanto más detalle tengamos de cómo está compuesto algo más acertadamente llegaremos a un punto específico.

El diseño racional de fármacos requiere de una definición molecular de la enfermedad y del agente que la causa para poder encontrar el blanco específico. Puede ser haciendo que una molécula clave deje de funcionar o encontrando un gen y silenciándolo. En cualquiera de los casos hay que hacer que la carta logre encontrar la puerta de nuestra casa o, como se ha expresado en otras metáforas, que la llave precisa encuentre su cerradura perfecta o que la bala mágica llegue a su único blanco.

Entrar en este terreno no es fácil. La mayoría de estos fármacos requieren, tanto en la fabricación como en su acción, de la participación activa de organismos vivos, como bacterias y células. Esto los hace tener unos altos precios en el mercado y necesitar ciertas condiciones para su manufactura.