



Medicina Molecular: nueva perspectiva en medicina

Hermes J. Garbán ¹.

¹Inmunólogo Molecular

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

Se podría decir que la revolución más importante en la biología moderna es la llamada "Revolución Genética". El impacto del conocimiento íntimo de nuestra información genética ha transformado casi todos los aspectos de la actividad humana y en especial a la medicina. La revolución genética comenzó ya hace muchos años pero hay una fecha que define el verdadero punto de cambio en el desarrollo de lo que hoy conocemos como genética molecular.

INTRODUCCIÓN

"It has not escaped our mechanism for notice that the specific pairing we have postulated immediately suggest a possible copy the genetic material."

J. D. Watson

F. H. C. Crick

Nature 1953 171:737-738

Sinopsis

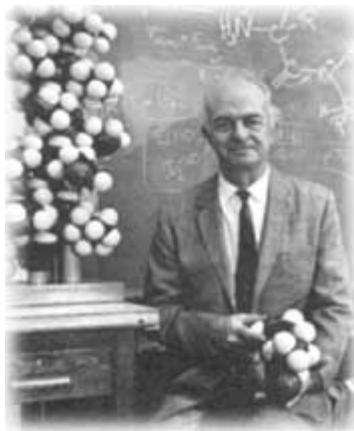
Se podría decir que la revolución mas importante en la biología moderna es la llamada "Revolución Genética". El impacto del conocimiento íntimo de nuestra información genética

ha transformado casi todos los aspectos de la actividad humana y en especial a la medicina. La revolución genética comenzó ya hace muchos años pero hay una fecha que define el verdadero punto de cambio en el desarrollo de lo que hoy conocemos como genética molecular. El 25 de abril de 1953, se publica la "[Estructura Molecular de los Ácidos Nucleicos](#)" por los Drs. James Watson y Francis Crick.

A partir de este punto, el desarrollo de la genética molecular ha permitido que se entienda no sólo el fenómeno genético, también muchos de los procesos asociados a la salud y a la enfermedad. De ahí que ahora nos permitamos agrupar gran parte de estos conceptos dentro de una nueva disciplina llamada "Medicina Molecular".

Introducción

La pasada mitad de siglo ha sido testigo de una evolución avasallante en el conocimiento dentro del área de las ciencias de la vida y un crecimiento en el entendimiento del fenómeno biológico, todo esto basado mayormente en los conceptos y herramientas provenientes de la genética molecular. De la misma manera podemos evaluar el impacto que todos estos desarrollos y conocimientos han tenido en la naturaleza biológica de los seres humanos. Ya es casi imposible hablar en un contexto médico sin referir algún concepto de biología molecular. Al revisar la literatura biomédica se puede percibir el dominio temático que tienen los aspectos de la biología molecular en cada una de las especialidades médicas.



La primera descripción de una enfermedad "molecular" la realizan [Linus Pauling](#) y sus colegas en 1949, cuando descubren una [mutación](#) en la molécula de hemoglobina responsable de la [Anemia Falciforme](#). A partir de este momento y hasta los años '60 se había logrado establecer la relación entre distintas enfermedades y cambios en sus respectivos genes. Ya para 1958 se habían reconocido aproximadamente 412 cambios genéticos, de los cuales en solo 103 de ellos se había logrado identificar la proteína afectada. En la actualidad conocemos un poco mas de cuatro mil desordenes genéticos y mas de doscientos defectos enzimáticos ([NCBI-Genes and Diseases](#)).

No siempre cuando hablamos de enfermedades moleculares nos referimos a cambios en un solo gen o proteína. Desafortunadamente muchas de las enfermedades son el producto de daños en múltiples genes o en genes asociados a un proceso específico, haciendo muy complicado tanto el diagnóstico como el tratamiento.

A pesar de la disponibilidad de muchas técnicas para el diagnóstico de enfermedades genéticas, las posibilidades terapéuticas son limitadas. No siempre contamos con las herramientas y recursos para enfrentar la información que somos capaces de generar. Esto trae como consecuencia una gran brecha entre lo posible y lo realmente controlable, generando muchos problemas en la toma de decisiones médicas. En muchas oportunidades esta información es generada dentro de un contexto puramente científico, que al trascender las fronteras del laboratorio puede ser mal interpretada y usada con fines de discriminación tanto social como económica. Debemos ser muy cautos de la información que somos capaces

de generar y ser prudentes al emitir nuestras opiniones al respecto, no siempre el manejar mas información significa mayor eficacia médica.

El impacto que la biología molecular ha tenido en la medicina no es restringido a sólo las enfermedades genéticas. Muchas de las enfermedades pueden ser analizadas desde la perspectiva molecular. Dentro de esta revisión estaremos describiendo las múltiples aristas de la Medicina Molecular. Comenzaremos exponiendo los conceptos básicos de la biología molecular para luego entender como fluye la información genética y como se desencadena un proceso mórbido con bases moleculares. Describiremos muy brevemente los desarrollos tecnológicos que han hecho posible el avance de la medicina molecular y que nos han permitido entender como se pueden utilizar estos en la clínica, desde el diagnóstico hasta el tratamiento de las enfermedades (Este último tema lo trataremos en un capítulo aparte en nuestro próximo número). También haremos referencia al uso de las técnicas de la biología molecular en el estudio epidemiológico. Finalmente, el impacto de la Medicina Molecular no deja de hacer eco en los aspectos éticos y sociales, enfrentando un nuevo siglo donde la [biotecnología](#) y el manejo de la información influirán en cada una de las actividades humanas.

Las revoluciones siempre han representado cambios, nuevos planteamientos a las exigencias de una sociedad dinámica. Estamos encarando una nueva revolución en vísperas de un nuevo siglo: la "Revolución Genética".

DOGMA CENTRAL DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR

Dogma central de la Biología Molecular



En 1871 [Miescher](#) aísla una nucleoproteína de naturaleza ácida de los núcleos de macrófagos provenientes del pus en los vendajes de los soldados, y la llama "Nucleína". En 1944, trabajando con Pneumococos, [Oswald Avery](#), [Colin MacLeod](#) y [Maclyn McCarty](#) demostraron que el ADN y no las proteínas eran responsables de la transmisión de los caracteres hereditarios en los organismos vivientes. Seis años más tarde, Chargaff prueba que existían igual número de nucleótidos de Adenina y de Timidina, al igual que de

Guanina y Citosina, en el ADN. Estos hallazgos junto al trabajo de cristalografía y difracción de rayos-X realizados por [Rosalind Franklin](#) y [Wilkins](#) condujeron a que en 1953 [James Watson](#) y [Francis Crick](#) postularan el modelo de la estructura del ADN como una doble cadena de nucleótidos apareados de manera complementaria en una conformación helicoidal. Esta estructura propuesta para el ADN permitió explicar como se transmitían los caracteres hereditarios abriendo el campo de la genética molecular.

Dos propiedades del ADN son particularmente relevantes en la tecnología aplicada a la medicina molecular. En 1961, basados en la co-linealidad entre las secuencias de

aminoácidos en las proteínas y el ADN, [Holley, Khorana, y Nirenberg](#) descifraron la primera de estas propiedades, el [código genético](#). Este es representado por tripletes de nucleótidos denominados codones que codifican para cada aminoácido en una cadena polipeptídica. Cambios en las bases nucleotídicas en el ADN pueden determinar el origen de muchas enfermedades.



La segunda propiedad importante del [ADN](#) es la de estar constituido por dos cadenas de nucleótidos unidos por un esqueleto de azúcar y fosfato, las cuales están- orientadas en sentido opuesto y son complementarias (A=T, G=C). En términos biológicos, la estructura de doble cadena del ADN es esencial para el proceso de replicación y garantiza que cada célula que se divide recibe una copia idéntica del ADN.

La [síntesis de proteínas](#) requiere la transferencia de información desde el ADN a otro polinucleótido con propiedades químicas y funcionales completamente distintas conocido como ácido ribonucleíco o ARN. Diferencias estructurales entre el ADN y el ARN que son relevantes en la medicina molecular incluyen, la naturaleza de cadena simple del ARN y la utilización de uracilo (U) en vez de timidina (T). La forma mas conocida de ARN es el ARN mensajero (ARNm), el cual sirve de intermediario entre el ADN y la proteína. Otra de las propiedades importantes que diferencian al ADN del ARN es la localización tejido-específica de este último. Mientras que el ADN es el mismo en todas las células de un organismo el ARN, y en especial el ARNm, sólo puede ser aislado del tejido donde se este produciendo activamente la proteína específica de interés. En términos de la tecnología de ADN recombinante, el ARNm de células eucariotas representa una gran ventaja con respecto al ADN, el ARN contiene sólo la información genética esencial que reside en los [exones](#) sin la información contenida en los [intrones](#).

El dogma que describe el flujo de la información genética desde el ADN transcrita a ARN y traducido luego a proteína, no es absolutamente cierto. En 1970, [Temin y Baltimore](#) demostraron que la transcriptasa reversa, una enzima que se encuentra en los retrovirus, permitía que el ARN se copiara a ADN. Esta enzima le dio a la ingeniería genética la posibilidad de sintetizar ADN complementario a partir de ARNm y de esta manera clonar sólo las regiones codificantes de los genes.

Los cambios o [mutaciones](#) que se suceden en la región codificadora de un gen no son los únicos que pueden dar origen a enfermedades. Dentro de la anatomía de un gen podemos encontrar secuencias reguladoras que al ser afectadas pueden causar problemas con los niveles de expresión de la proteína a la cual regulan y causar problemas por exceso o defecto de la misma. En este mismo orden de ideas, cambios o defectos en los factores que regulan el proceso de transcripción de uno o varios genes pueden desencadenar patrones de expresión anormales de proteínas.

DESARROLLOS TECNOLÓGICOS EN MEDICINA MOLECULAR

Desarrollos tecnológicos en Medicina Molecular

Para poder analizar la información contenida en las largas cadenas de ADN que forman los cromosomas, hay que realizar "mapas" que zonifiquen la información y que permitan estimar cambios que puedan ser responsables de enfermedad. Los mapas cromosomales sólo dan una idea general de la morfología y número de los mismos sin reflejar detalles moleculares que permitan dar una idea de la estructura y contenido de la información genética.

Al finalizar la década de los '60 y al comienzo de los '70, Smith, Nathans y Arber aislaron unas enzimas provenientes de bacterias que llamaron "endonucleasas de restricción". La característica que hacía a estas enzimas tan especiales era que podían cortar el ADN en secuencias específicas de nucleótidos, funcionaban como un bisturí molecular. Podemos usar endonucleasas de restricción para elaborar mapas de restricción de una muestra de ADN y compararlo con otra muestra de ADN donde se sospecha que ha sucedido una mutación. Si la mutación afecta la secuencia de un sitio de restricción entonces este desaparece y el patrón de digestión del ADN cambia.

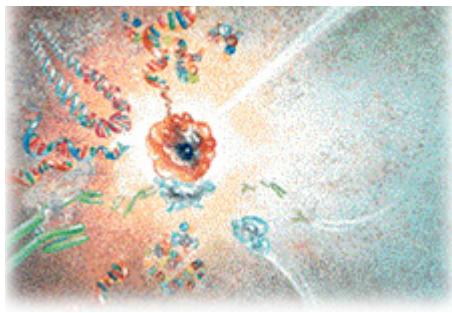
También por este tiempo se descubre otra enzima llamada ADN ligasa, la cual se encarga de unir pedazos de ADN, como especie de suturas moleculares. No es difícil imaginar que sucedió luego al combinar estas dos tecnologías, la posibilidad de hacer "ADN recombinante"; al unir pedazos de ADN que no necesariamente provienen del mismo organismo. En 1972, Berg realiza la primera molécula de ADN recombinante y nace la "Ingeniería Genética" una forma de cirugía molecular. En este mismo año Cohen y sus colegas demostraron que fragmentos de ADN pueden ser ligados a fragmentos circulares de ADN de origen bacteriano llamados "Plásmidos", que luego son reintroducidos en bacterias y son replicados ilimitadamente, es decir "clonados". El primer gen eucariota en ser clonado fue la b globulina de conejo en 1976.

Otra forma de analizar el ADN es estudiando su estructura primaria, es decir leer las bases que lo componen. Esto fue posible gracias a dos métodos de secuenciación desarrollados en 1975 y 1977 por F. Sanger y W. Gilbert. Al analizar algunos genes se observó que en eucariotas estos son discontinuos, es decir, las secuencias codificantes son interrumpidas por segmentos espaciadores que no son traducidos. Para distinguir entre estos dos tipos de secuencias, en 1978 Gilbert acuñó los términos de "exon" e "intron".

El desarrollo de sondas moleculares, a mediados de los años '60, surgió a partir de la observación de que las dos hebras de ADN pueden ser separadas y luego re-hibridizadas en base a la propiedad de complementariedad de los ácidos nucleicos. Las sondas moleculares son pequeños fragmentos, generalmente de ADN, que pueden ser marcados. De esta manera podemos digerir muestras de ADN con enzimas de restricción, separar los distintos fragmentos generados en base a sus diferencias en tamaño en una electroforesis, transferir los fragmentos a membranas sólidas e hibridizar con la sonda molecular marcada. Este proceso fue desarrollado por E. M. Southern en 1975 y es conocido como Southern blotting y es de mucha utilidad hoy día en el diagnóstico molecular.



Basados también en la propiedad de complementariedad



de los ácidos nucleicos y en la síntesis *in vitro* de ADN usando ADN polimerasa, en 1985 [K. Mullis](#) y colegas desarrollaron una poderosa técnica de amplificación específica de fragmentos de ADN. Esta técnica es mejor conocida como la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction) o [PCR](#). En un corto período de tiempo, la PCR se ha convertido en una pieza importante en el diagnóstico y en la investigación en la biología molecular. Hoy día es posible amplificar fragmentos de ADN provenientes de una sola célula.

Variaciones y combinaciones de estas técnicas y conocimientos provenientes de la biología molecular, han desencadenado innumerables estrategias para estudiar el material genético y la información contenida en el mismo. Cabe destacar en este momento uno de los proyectos de mas alta envergadura en la medicina molecular, el "[Proyecto Genoma Humano](#)".

El Proyecto Genoma Humano es una iniciativa multidisciplinaria e internacional iniciada por el [Departamento de Energía](#) y el [Instituto Nacional de la Salud](#) de los Estados Unidos de Norteamérica que comenzó a operar en 1988. El objetivo de este proyecto es el clonar y secuenciar por completo el genoma humano antes del año 2005. Dos componentes esenciales en este proyecto son el realizar mapas genéticos y físicos en el ser humano. El otro componente fundamental es la Informática, es decir, como los datos generados son almacenados y distribuídos rápidamente a la comunidad científica para su análisis y el desarrollo de herramientas que faciliten el mismo.

IMPLICACIONES CLÍNICAS

Implicaciones clínicas



El desarrollo tecnológico en la biología molecular y en especial en la genética molecular han abierto un sin fin de ventajas clínicas indiscutibles en la práctica médica diaria. La sensibilidad y especificidad de las técnicas usadas en el diagnóstico directo de defectos genéticos o agentes etiopatogénicos asociados a los procesos mórbidos representan una herramienta valiosa en la medicina. Muchos de los conocimientos generados desde el punto de vista científico son traducidos casi de inmediato a una aplicación clínica y por supuesto en entender mejor el fenómeno salud-enfermedad. Pero, entender las bases moleculares que rigen las enfermedades no es suficiente. Usando muchas de estas mismas tecnologías se ha permitido intervenir desde el punto de vista terapéutico y cambiar el rumbo de la enfermedad e incluso prevenirla, se habla ya de terapia genética.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Diagnóstico molecular



Quizás el área médica donde mayor aplicabilidad ha encontrado la biología molecular ha sido en el área del diagnóstico de enfermedades. Como consecuencia lógica tenemos que el impacto mas importante ha sido en la caracterización y determinación de las bases moleculares de las enfermedades de origen genético. Sin embargo, el uso de técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas está siendo desarrollado con bastante aceptación por los médicos en la medida que se conozca mejor la genética de los microorganismos involucrados en la enfermedad y la validación de los protocolos diagnósticos.

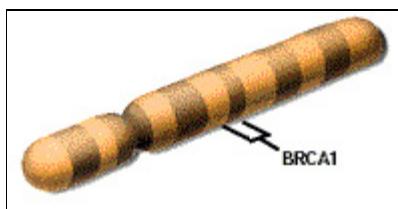
GENÉTICA MÉDICA

Genética Médica

Las enfermedades genéticas pueden ser clasificadas de muchas maneras. Por ejemplo, pueden ser causadas por defecto en un solo gen o en varios genes o pueden ser producto de muchos factores donde hay elementos epigenéticos que contribuyen a la enfermedad. Hay enfermedades donde es afectado el cromosoma, o también hay otras donde el cambio se sucede en células somáticas.

Existe todo un compendio de información que recopila y clasifica los genes humanos y las enfermedades genéticas asociadas. Esta enciclopedia de localización de genes, conocida como "La herencia Mendeliana en el Hombre" o MIM (Mendelian Inheritance in Man), fue publicada por primera vez en 1966 con 1487 entradas. Hoy día se puede acceder a esta información a través de su versión "online" ([OMIM](#)) en el Internet, con mas de 10.000 entradas.

Quizás el aporte mas importante de la genética molecular a la genética médica ha sido la identificación y caracterización de cambios genéticos responsables de enfermedades. Se utilizan estrategias tales como el "clonamiento funcional", el cual, parte de la información clínica de la función alterada en un proceso patológico donde se conoce cuales elementos están afectados. Un buen ejemplo de esto lo representa la Hemofilia A, en la cual se conoce que el elemento afectado es el factor VII de coagulación, desde este punto se clona y se caracteriza el gen relevante.



Otra alternativa es el "clonamiento posicional", el cual se refiere a la identificación y clonamiento de un gen en base a su posición en un cromosoma en vez de sus propiedades funcionales.

En todo caso lo primero que se hace para poder identificar un gen responsable de una enfermedad de origen genético es el establecer un "[análisis de relación o enlace](#)" con el cual se identifica un marcador molecular específico para la enfermedad en cuestión. No necesariamente el marcador identificado forma parte del gen afectado, pero se encuentra tan cerca que se segregan de manera similar, esto se denomina

"desequilibrio de enlace".

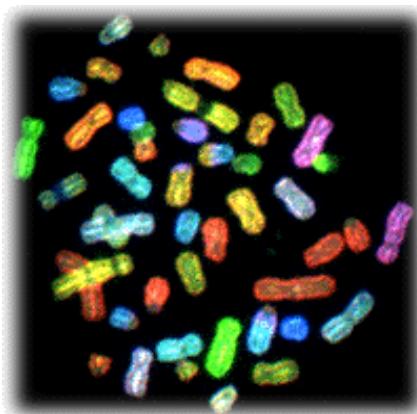
Usualmente se asume una variación en el tamaño de los fragmentos de ADN entre los pacientes normales y los portadores de una enfermedad genética, esto se llama polimorfismo del ADN. Esta variación en el tamaño de los fragmentos de ADN puede ser causada por: A) Mutaciones puntuales, que de manera aleatoria agregan o eliminan sitios de restricción. Este polimorfismo es llamado RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). B) Inserciones de secuencias repetitivas entre dos sitios de restricción en un fragmento de ADN. Estas secuencias repetidas pueden ser multi-alélicas y generar polimorfismo de tamaños variables llamados mini-satélites o [VNTR](#) (Variable Number of Tandem Repeats). C) Variaciones en el número de repeticiones asociadas con un motivo simple que se repite, usualmente compuesto de 2 a 4 nucleótidos llamados micro-satélites o SSRs (Simple Sequence Repeats).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido de mucha utilidad en la amplificación de fragmentos de ADN a partir de material genético escaso que luego puede ser sometido al análisis de polimorfismo que hemos señalado anteriormente, facilitando el estudio de relación entre cambios en el ADN y enfermedad.

Una vez identificado un marcador específico ligado a una enfermedad genética, se pueden producir "sondas moleculares" que se usan en hibridizaciones (generalmente Southern blotting) con material genético extraído de pacientes, con fin diagnóstico.

El patrón de oro en el diagnóstico molecular de las enfermedades genéticas es la determinación de la secuencia de nucleótidos en el ADN y la presencia de cambios o mutaciones que sugieran el origen de una enfermedad. En la actualidad es posible generar fragmentos discretos de ADN por medio de la PCR y secuenciarlos para determinar variaciones en la estructura primaria del ADN. Desafortunadamente esta técnica presenta muchas limitaciones tanto de costo como de capacidad diagnóstica cuando nos enfrentamos a muchos cambios en la secuencia del ADN o a los patrones de mutación que originan una enfermedad en donde están involucrados varios genes.

El análisis de mutaciones ofrece una alternativa viable en la evaluación de cambios puntuales que puedan estar relacionados con una enfermedad genética. Muchos métodos se han desarrollado, de los cuales cabe destacar: A) La electroforesis en gel de gradiente denaturalizante o DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) B) Polimorfismo conformacional de cadena simple o SSCP (Single-Stranded Conformation Polymorphism).



El clásico kariotipo también se ha visto modificado y optimizado con adaptaciones provenientes de la biología molecular. Usando sondas moleculares marcadas con reactivos fluorescentes, pueden hibridizar con regiones específicas dentro de los cromosomas revelando la presencia de secuencias aberrantes o cambios estructurales sugestivos de enfermedad genética. La técnica mas conocida que se emplea hoy en día en análisis cromosomal es el [Fish](#) (Fluorescence *in situ* hybridization).

Es imposible resumir el número de avances que involucra el

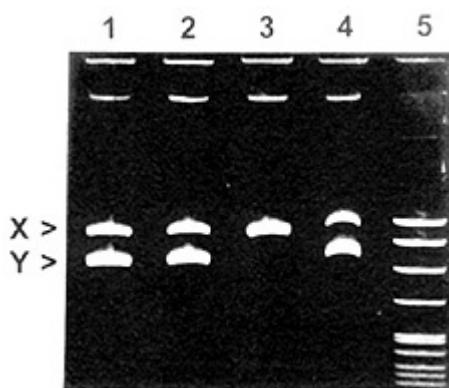
aporte de la genética molecular a la genética médica. Mucho de lo que se conoce al respecto se encuentra compilado en una base de datos disponible a través del Internet en el Centro Nacional de Información Biotecnológica ([NCBI](#)).

DIAGNÓSTICO FETAL Y NEONATAL

Diagnóstico Fetal y Neonatal

El avance en la tecnología de la reproducción y en los métodos de diagnóstico por imágenes han contribuido al desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas apoyadas en conceptos de genética molecular. Disponibilidad de muestras provenientes de fetos, casi desde el momento mismo de la fertilización, sangre fetal y muestreo de vellosidades coriónicas se han combinado con la sensibilidad y especificidad de los métodos moleculares para proveer una evaluación integral antes del nacimiento.

Las estrategias diagnósticas basadas en análisis del ADN son básicamente las mismas descritas anteriormente donde predominan tres grandes grupos: A) Mapas de ADN basados en polimorfismo (RFLP, VNTR, SSRs, etc.), o análisis de enlace o correlación del ADN con el desarrollo de sondas específicas usadas en "Southern blotting". Otra posibilidad usada en el diagnóstico es la llamada "exclusión prenatal" en la cual el familiar en riesgo de poseer un desorden genético (usualmente es referido en la enfermedad de Huntington) no desea saber su situación de portador pero manifiesta el deseo de determinar el riesgo reducido en el feto de ser portador de la enfermedad. B) Amplificación de ADN por la PCR para determinar polimorfismo del ADN o secuencias específicas de genes relacionados con enfermedad. En muchos casos esta técnica tiende a sustituir la realización de mapas de ADN. C) Hibridación *in situ* Fluorescente o FISH para identificar anormalidades cromosómicas. Como fue mencionado anteriormente, esta técnica está basada en el uso de sondas moleculares marcadas con reactivos fluorescentes que luego son hibridizadas con secuencias homólogas dentro de los cromosomas. Se usa en combinación con técnicas citogenéticas convencionales y tiende a substituir a las mismas en el diagnóstico prenatal.



Otras áreas en el diagnóstico prenatal que están siendo explotadas desde el punto de vista molecular es la determinación del sexo del feto, determinación de trastornos inmunológicos y mas recientemente el diagnóstico de infecciones congénitas.

Siguiendo la tendencia en el desarrollo de estas técnicas diagnósticas prenatales podemos estimar que muy pronto se podrá hacer diagnóstico genético antes de la implantación de un ovocito fertilizado. Tal es el caso de la fertilización *in vitro*, donde se puede tomar una muestra de un par de blastómeros indiferenciados sin afectar el pre-embrión para hacer estudios basados en amplificación del ADN por la PCR. Esto es posible actualmente en la selección de pre-embiones masculinos, que estarían severamente afectados cuando la madre es portadora de un desorden genético

ligado al cromosoma X.

Muchas otras enfermedades pueden ser evaluadas luego del nacimiento para determinar errores innatos del metabolismo u otras patologías que pueden ser corregidas en estadios tempranos de la vida si son diagnosticadas a tiempo. Cada vez mas se usa la amplificación del ADN por la PCR como técnica de elección en el diagnóstico de recién nacidos con muestras provenientes de una gota de sangre.



La intervención molecular prenatal o neonatal no termina en el diagnóstico. Muchas estrategias terapéuticas *in utero* están siendo desarrolladas y hoy día existe la posibilidad de hacer transfusiones sanguíneas, tratamiento con drogas recombinantes y transplantes medulares intrauterinos. En un futuro no muy lejano, la posibilidad de usar estrategias de terapia genética de células somáticas para corregir enfermedades en el feto abre una alternativa posible en la solución de estos problemas.

Las posibilidades son ilimitadas pero hay que ser muy cautos a la hora de emitir un resultado en un ambiente donde no se le pueda ofrecer alternativas al paciente. No siempre se cuenta con la posibilidad y recursos para hacer uso apropiado del conocimiento.

MICROBIOLOGÍA E INFECTOLOGÍA

Microbiología e Infectología

La identificación de organismos patógenos, clasicamente está fundamentada en el estudio de características fenotípicas. Los microorganismos asociados a una enfermedad son identificados por medio de tinción y observación bajo el microscopio, cultivo, características bioquímicas o de crecimiento o reactividad inmunológica (reconocimiento por anticuerpos). Sin embargo, la mayoría de estas técnicas no son siempre disponibles y consumen mucho tiempo antes de obtener un resultado, o presentan bajos niveles de sensibilidad o especificidad. Con el tiempo muchos de estos métodos serán complementados o sustituidos por análisis de características genotípicas.

Las estrategias diagnósticas usando técnicas de biología molecular en enfermedades infecciosas pueden ser resumidas de la siguiente manera: A) Amplificación del ADN del organismo patógeno (PCR, LCR, etc.). B) Hibridación (Southern blots, dot blots, sondas moleculares, etc.). C) Hibridación *in situ* con sondas moleculares (ADN o ARN) o amplificación del ADN *in situ*.

Un requisito indispensable para el uso de la biología molecular en el diagnóstico de agentes patógenos es el conocer parcial o totalmente el genoma del organismo en cuestión. Para poder desarrollar sondas moleculares específicas a un organismo tenemos que haber clonado y secuenciado o parcialmente caracterizado el material genético que permita identificar

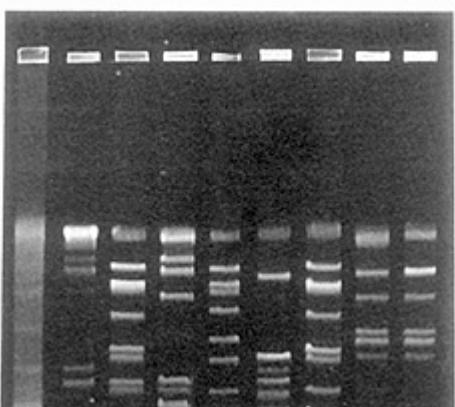
regiones específicas a cada organismo y a cada especie. Con frecuencia se usan secuencias repetitivas en el ADN (i.e. ARN ribosomal) que generan patrones distintivos de hibridación similares al polimorfismo observado en eucariotas.

Una vez identificada la secuencia específica perteneciente al organismo patógeno, el proceso diagnóstico sigue los mismos principios descritos anteriormente para el uso de mapas de restricción, amplificación del ADN o hibridación. Basados en técnicas de biología molecular el diagnóstico microbiológico se encuentra limitado principalmente por la representación del material genético perteneciente al organismo patógeno en la muestra a ser estudiada y la sensibilidad del mismo a ser degradado.

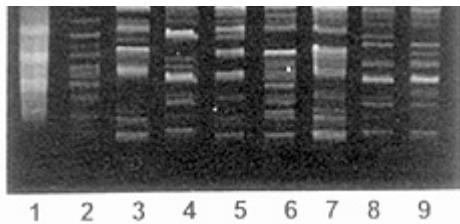
Muchas ventajas pueden ser adscritas al uso de sondas de ADN y a las técnicas de amplificación del ADN, las cuales podemos resumir en: A) Alta sensibilidad. B) Alta especificidad. C) Rapidez en el diagnóstico D) relativo bajo costo. Debido a la alta sensibilidad de estas técnicas, el mayor riesgo es el de contaminación de las muestras, lo cual disminuye la especificidad. Esto es particularmente cierto en el caso de la amplificación del ADN por la PCR, donde es posible amplificar secuencias de ADN a partir de una sola copia del genoma del organismo patógeno.

Esta altísima sensibilidad es particularmente útil en el diagnóstico de infecciones virales. En un estudio multicéntrico donde se compararon, usando PCR, 105 pacientes seronegativos para VIH-1 (Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1) y 99 pacientes seropositivos/cultivos positivos para el mismo virus, se demostró un porcentaje de sensibilidad del 99% y especificidad del 94,7% para el diagnóstico hecho por PCR (Sheppard, 1991). En la actualidad existen firmas comerciales encargadas de distribuir kits diagnósticos para VIH-1 basados en la PCR con sensibilidad entre 97-100% y especificidad del 100%. También están disponibles comercialmente, kits que permiten evaluar la carga viral basados en la misma tecnología. Este último punto es de mucha importancia a la hora de evaluar la respuesta al tratamiento.

Muchos otros virus son diagnosticados por medio de técnicas de amplificación del ADN o hibridación, tal es el caso de Virus de Papiloma Humano (VPH) y todos sus genotipos al igual que el Virus de la hepatitis C. Comparando distintos métodos diagnósticos para el Virus de Hepatitis B (HBV) se encontró que el inmunoensayo enzimático era capaz de detectar $\sim 3 \times 10^7$ partículas virales por mL de suero. Usando hibridación de ADN, incrementa la sensibilidad a niveles de detectar $\sim 10^5$ partículas virales por mL de suero. Aplicando amplificación por la PCR se logra detectar entre 1-10 copias de virus por mL.



Muchos otros agentes patógenos pueden ser diagnosticados usando tecnología molecular, en donde la mayor ventaja no sólo radica en la sensibilidad o especificidad, sino en el corto tiempo para la obtención del resultado. La meningitis tuberculosa afecta a mas del 10% de los pacientes con tuberculosis y a pesar de existir tratamiento efectivo, la mortalidad y la morbilidad permanecen alta. Esto puede ser debido a un retardo en el diagnóstico, el cual, usualmente depende de la



visualización del mycobacterium bajo el microscopio, usando tinciones especiales con muy baja sensibilidad, o el uso del inmunoensayo enzimático de muestras de líquido cefalorraquídeo. El cultivo confirmatorio de la infección por mycobacterium puede tomar entre dos a tres semanas en dar resultados. Usando la PCR podemos obtener resultados confirmatorios con bastante buena sensibilidad y discriminación entre especies en menos de seis horas desde la toma de la muestra.

Muchas de las infecciones por organismos intracelulares pueden ser diagnosticadas con relativa facilidad con la ventaja agregada de poder hacer distinciones taxonómicas entre las especies de una misma familia en relativo corto tiempo.

El desarrollo de nuevas sondas moleculares y la validación de muchos protocolos de amplificación por la PCR, están aumentando en forma exponencial y muy pronto muchas de las técnicas convencionales en el laboratorio de microbiología se verán complementadas o substituidas por técnicas que involucren el uso de la genética molecular.

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

Epidemiología Molecular

Otro aspecto importante del uso de la biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas es el poder establecer patrones epidemiológicos más precisos. Métodos convencionales basados en fenotipificación de patógenos no son muy exitosos en estudios epidemiológicos. Cambios en el espectro de los agentes infecciosos, epidemias intra-hospitalarias y pacientes inmunocomprometidos han forzado la necesidad de nuevas estrategias en los estudios epidemiológicos que complementen o substituyan los métodos tradicionales.

Cinco estrategias basadas en la caracterización del ADN proveniente de organismos patógenos son posibles candidatos en estudios de epidemiología molecular: A) Hibridación de ácidos nucléicos. B) Identificación de plásmidos. C) Análisis de patrones de banda cromosomales. D) PCR. E) Secuenciación.

El uso de estas estrategias en la monitorización epidemiológica permite establecer la progresión de especies patógenas hacia la adquisición de resistencia a los agentes terapéuticos disponibles por variaciones genotípicas o mutaciones. Esto permite determinar con mayor certeza y rapidez las alternativas terapéuticas efectivas en el control de las enfermedades infecciosas y en especial cuando nos referimos a infecciones nosocomiales.

La relativa estabilidad del material genético ofrece una ventaja importante en los estudios epidemiológicos. Muestras provenientes de poblaciones alejadas a los centros de investigación pueden ser recolectadas y trasladadas sin relativo riesgo de pérdida o descomposición, sin hacer uso de métodos complicados de preservación. Malaria sigue siendo uno de las principales causas de morbi-mortalidad por enfermedades infecciosas en el mundo. Muchas

de las zonas endémicas se encuentran aisladas o son de difícil acceso. Muestras representadas por una gota de sangre periférica fijada a un papel de filtro, pueden ser almacenadas y trasladadas desde las regiones endémicas hasta los centros de investigación, sin necesidad de agregar preservativos o refrigeración. Otra alternativa es el uso de laboratorios portátiles de biología molecular que son tan pequeños y versátiles que todo puede ser empacado en una pequeña valija y son alimentados por energía solar. Todo esto reduce costos y aumenta eficiencia a la hora de evaluar situaciones epidemiológicas en el campo y tomar decisiones con mayor certeza para el control de las mismas.

La epidemiología molecular no se limita a las enfermedades infecciosas, es posible usar estas mismas estrategias para el estudio epidemiológico de enfermedades genéticas o que posean un componente genético. Existen asociaciones entre polimorfismo de ciertos genes involucrados en el control de la presión arterial y la presencia de infarto del miocardio. Muestreos epidemiológicos de este tipo permitirían establecer poblaciones de riesgo en donde se pueda intervenir de manera preventiva para disminuir la incidencia de estas enfermedades.

Se están desarrollando estrategias para el uso de esta tecnología de manera rutinaria en muchos estudios epidemiológicos e incrementa el número de pruebas validadas para evaluar por genotipificación muchos de los paradigmas epidemiológicos en la actualidad. Lo mas importante de la epidemiología molecular es brindar una evaluación certera de una situación específica y dar una respuesta educada y a tiempo con decisiones basadas en un mínimo de incertidumbres.

Para finalizar, en la primera parte de esta revisión hemos explorado el vasto mundo de aplicaciones de la genética y la biología molecular en la medicina y en especial en su capacidad diagnóstica y de análisis epidemiológico. Es preciso recalcar la influencia que hoy día estos conceptos tienen en el entendimiento del fenómeno salud-enfermedad. Como dijimos en el comienzo de esta revisión, actualmente es muy difícil hablar de medicina sin referir algún concepto de biología molecular. Por tal motivo, el tratar de resumir estos, es una tarea casi imposible pero esperamos que el sabor del tema les haya quedado en sus mentes.

En la segunda parte de esta revisión se explorarán los siguientes temas:

- Oncología molecular
- Terapia molecular
- Biotecnología
- Terapia genética
- Inmunología molecular
- Vacunas de ADN
- Medicina Forense
- Aspectos sociales y éticos
- El Futuro

Este es un tema fascinante que propicia el trabajo multidisciplinario con la participación de gran diversidad de profesionales de distintas áreas del conocimiento en pro de un fin común, "salud integral". La definición del equipo de medicina molecular establece la cooperación

entre geneticistas, internistas, médicos familiares, enfermería, grupos de soporte, científicos e investigadores, psicólogos, familiares y otros trabajadores de la salud que unan fuerzas en la resolución de problemas de salud de individuos y de la población en general. El implementar esta dinámica de trabajo en equipo, es crítico en el futuro desarrollo de la medicina molecular.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Alberts, B. (1983). Molecular biology of the cell. New York, Garland Pub.
2. Davis, B. D. and American Academy of Arts and Sciences (1991). The Genetic revolution : scientific prospects and public perceptions. Baltimore, Johns Hopkins University Press.
3. Freifelder, D. (1978). The DNA molecule : structure and properties : original papers, analyses, and problems. San Francisco, W. H. Freeman.
4. Hesketh, R. (1997). The oncogene and tumor suppressor gene factsbook. San Diego, Calif., Academic Press.
5. Lemonick, M. D. (1999). Designer Babies: Parents can now pick a kid's sex and screen for genetic illness. Will they someday select for brains and beauty too? Time. 153: 64.
6. Lemonick, M. D. and D. Thompson (1999). Racing To Map Our DNA: Competition from private labs has forced the Human Genome Project into a frantic rush to finish first. Time. 153: 44.
7. Mendible, J. C. (1997). Acidos Nucléicos: La Guia/Desde el descubrimiento del DNA hasta nuestra amiga DOLLY. Cátedra de Bioquímica. Escuela "Luis razetti". Facultad de Medicina. Caracas, Universidad Central de Venezuela: 133.
8. Mueller, R. F., I. D. Young, et al. (1998). Emery's elements of medical genetics. Edinburgh ; New York, Churchill Livingstone.
9. Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
10. Schulte, P. A. and F. P. Perera (1993). Molecular epidemiology : principles and practices. San Diego, Academic Press.
11. Stryer, L. (1995). Biochemistry. New York, W.H. Freeman.
12. Trent, R. J. (1997). Molecular medicine : an introductory text. New York, Churchill Livingstone.
13. Watson, J. D. (1997). The double helix : a personal account of the discovery of the structure of DNA. London, Weidenfeld & Nicolson.
14. Watson, J. D. (1992). Recombinant DNA. New York, Scientific American Books : Distributed by W.H. Freeman.
15. Watson, J. D., J. Tooze, et al. (1983). Recombinant DNA : a short course. New York, Scientific American Books : Distributed by W.H. Freeman.