

ARCHIVO HISTÓRICO



El presente artículo corresponde a un archivo originalmente publicado en el **Boletín de la Escuela de Medicina**, actualmente incluido en el historial de **Ars Medica Revista de ciencias médicas**. El contenido del presente artículo, no necesariamente representa la actual línea editorial. Para mayor información visitar el siguiente

vínculo: <http://www.arsmedica.cl/index.php/MED/about/submissions#authorGuidelines>

ADN recombinante en el diagnóstico clínico

*G. Kaltwasser G.

RESUMEN

La biología ha evolucionado al grado que hoy sus métodos de análisis son a nivel molecular. Derivado de este conocimiento se han desarrollado tecnologías altamente sofisticadas; una de ellas es la tecnología de ADN recombinante, la que permite manipular in vitro la información contenida en el genoma de una célula. Una de sus aplicaciones es en el diagnóstico clínico para la detección de agentes patógenos y/o condiciones particulares del material genético que derivan en una patología determinada.

Todos los organismos codifican su información genética en el ADN (ácido desoxirribonucleico) o ARN (ácido ribonucleico). Este conocimiento fundamentado en los experimentos de transformación de cepas avirulentas en virulentas de neumococos (Avery, Mc Lead y Mc Cartty, 1944, y los de Watson y Crick 1953), que señalan que el ADN posee una estructura de doble hebra complementaria, lo que permite a esta molécula servir de molde o templado para dirigir la formación de otras dos moléculas idénticas a la original y en la que la información genética está codificada en un arreglo lineal de bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y timidina); son las bases fundamentales de la bioquímica de los ácidos nucleicos y su relación

con la mantención de la información genética. Investigaciones posteriores han permitido: 1) descifrar el código genético (secuencias de bases nitrogenadas del ADN —tripletes— que reconocen aminoácidos particulares) y, a su vez, el orden secuencial de los tripletes establecen una secuencia proteica definida y 2) conocer elementos estructurales propios de los ácidos nucleicos y enzimas que modifican su estructura (polimerasas, ligasas, nucleasas, etc.), lo que ha permitido disponer de nuevos elementos para entender los complejos mecanismos de la expresión génica y su regulación.

A partir de este conocimiento ha surgido una tecnología orientada a manipular los mecanismos básicos de transferencia de información con el fin de obtener provecho con distintos objetivos, que van, desde la mejoría y la preservación indefinida de organismos, hasta la obtención de cantidades masivas de proteínas de interés particular como son hormonas, vacunas, antibióticos, toxinas y otras de varia-

*Laboratorio de Microbiología, CEDIUC, Facultad de Medicina y Laboratorio de Endocrinología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

do orden. A esta tecnología biológica se le denomina Tecnología de ADN Recombinante (rADN).

Mirando con un interés médico, esta nueva tecnología nos permite hoy en día contar con un novedoso enfoque en el diagnóstico clínico. Enfermedades hereditarias, patologías crónicas, cáncer, enfermedades infecciosas se pueden ver beneficiadas en su diagnóstico y/o tratamiento con procedimientos derivados del manejo de la bioquímica de ácidos nucleicos.

ELEMENTOS BASICOS DE rADN

La tecnología de ADN recombinante está basada en cinco elementos básicos (Figura 1):

- en la posibilidad de cortar, unir y copiar específicamente la doble hebra de ADN mediante enzimas llamadas nucleasas de restricción, ligasas y polimerasas, respectivamente;
- en la hibridización de ácidos nucleicos, que permite identificar secuencias específicas de ADN o ARN con precisión por la propiedad

de unirse que tienen secuencias complementarias;

- en la capacidad de multiplicar a voluntad un gen particular, así un trozo específico de ADN es integrado a un virus o plasmidio que le permite, a su vez, la amplificación en una bacteria o levadura;
- en la posibilidad de conocer la secuencia precisa de nucleótidos de un trozo de ácido nucleico;
- en la posibilidad de marcar (con isótopos radiactivos u otras moléculas) el ácido nucleico para su localización posterior.

Hoy en día se conoce un número elevado de genes que codifican otro tanto número de proteínas; así, al tener a la mano un gen específico, nos permite contar con una poderosa arma para conocer si este gen se encuentra presente en el material genético de una muestra clínica que nos interesa analizar, tales como aislados infecciosos, especímenes quirúrgicos, células sanguíneas. El principio básico involucrado radica en que la información genética está en el ADN y que el poseer éste una doble hebra, un gen

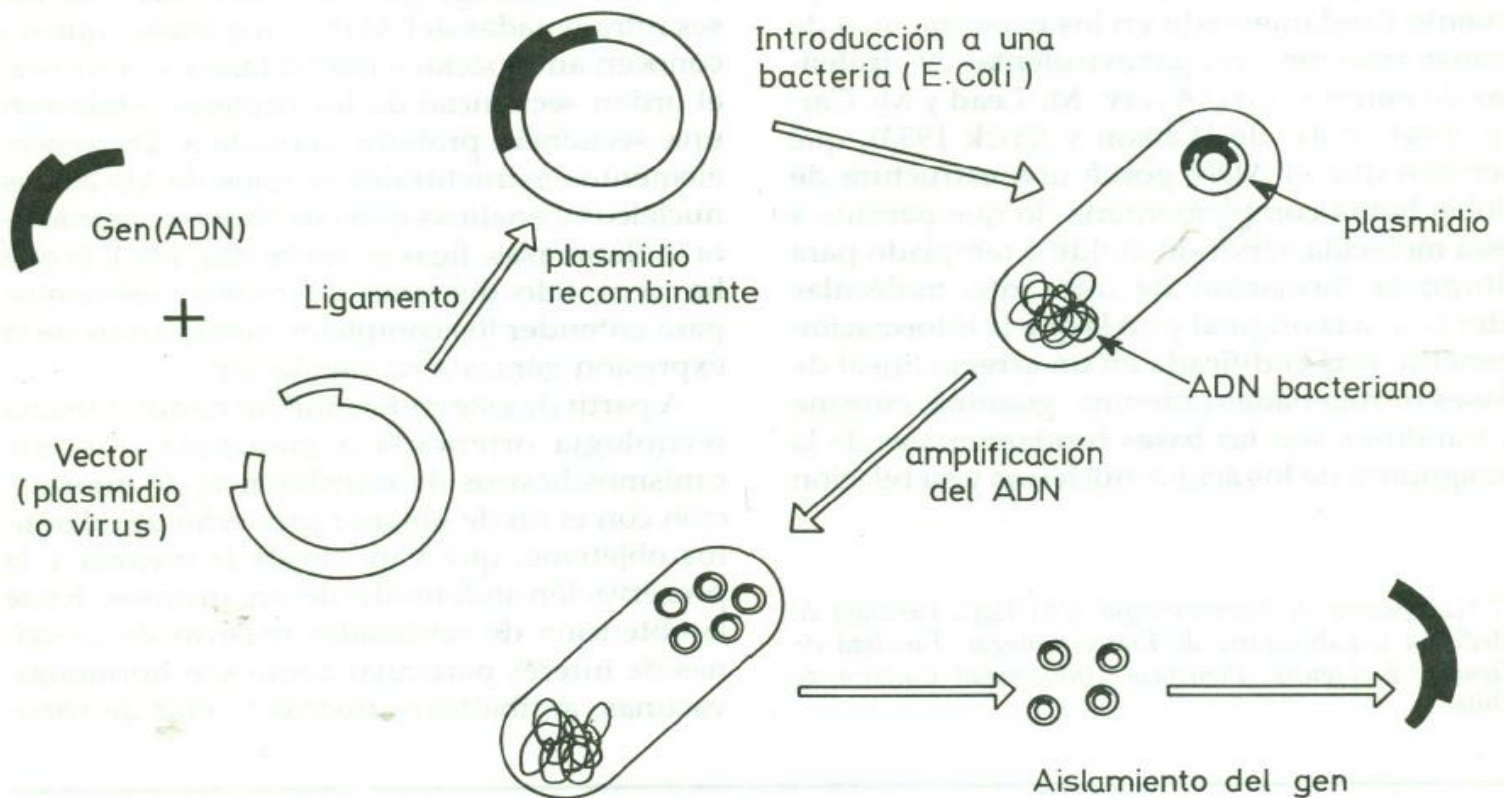


FIGURA 1. Generación masiva (clonamiento) de un gen de interés (adaptado de Referencia N° 3).

particular puede ser detectado al hibridizarlo con una hebra complementaria al gen de interés. Una de las dos hebras (la que incubamos con la muestra) tiene nucleótidos marcados con una molécula que permite su identificación o visualización: ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , ^3H , biotina.

La hibridización depende de variables tales como la complementariedad de las secuencias, su longitud, condiciones físico-químicas de las soluciones de reacción y temperatura. Cambiando estos parámetros se modifica la especificidad de la hibridización, se hace más o menos rigurosa; así mientras más rigurosas son las condiciones, sólo secuencias perfectamente complementarias pueden hibridizar; con una estrictez reducida secuencias no del todo complementarias pueden hacerlo. De este modo uno puede reconocer la presencia del gen conocido en el material clínico disponible.

El diagnóstico de ciertos agentes infecciosos hoy en día es difícil de lograr, no se puede hacer o es tan largo que el conocer la etiología precisa no es relevante para un adecuado tratamiento. Casos clásicos lo representan infecciones virales, parasitarias y ciertos agentes bacterianos de importancia médica como mycobacterias, enterobacterias, etc. ¿Cómo puede ser utilizado este nuevo conocimiento biológico?

UN CASO CLINICO

A modo de ejemplo imaginemos que poseemos un gen (ojalá uno que confiera patogenicidad) de *Mycobacterium tuberculosis*. *In vitro*, lo podemos multiplicar, marcar a voluntad y separar sus dos hebras; es decir, tenemos un gen aislado al que es posible hacerlo hibridizar con su hebra complementaria (gen) presente en el material genético (ADN) contenido en células de una muestra de desgarro o líquido pleural. Las mycobacterias de la muestra se concentran, se aplican sobre un soporte (filtro), se degradan exponiendo todo el ADN contenido en las células quedando éste pegado al filtro y sus hebras separadas; luego se le permite hibridizar con el gen que hemos manipulado *in vitro* (marcado, aislado y con su doble hebra separada); se elimina el material que no hibridizó y el filtro se expone por 12-18 horas con una película para Rayos X, se revela y examina si en el sitio en que se aplicó el material clínico hay un velamiento

del film (hibridización positiva) (Figura 2). El procedimiento ha tomado entre 24-48 horas contra 1-2 horas de la baciloscopía, pero es 50-100 veces más sensible. En principio necesitaríamos alrededor de 50-100 bacterias/ml de muestra para encontrar una señal positiva. Un extendido (baciloscopía) necesita no menos de 10.000 bacterias/ml para encontrar una por campo y ser informada como positiva.

La sensibilidad y especificidad de la hibridización de ácidos nucleicos es tal, que es posible detectar un gen particular del que existe una sola copia en todo el genoma utilizando un fragmento complementario que puede ser de tan sólo 20 nucleótidos de largo. Es decir, esta secuencia es capaz de reconocer su mitad complementaria dentro de 4×10^9 nucleótidos, que es el tamaño del genoma humano.

Otro ejemplo

En el genoma humano hay cada 100-200 pares de bases —en regiones que no codifican para proteínas o señales reguladoras— mutaciones neutras, es decir, no tienen efecto visible sobre el fenotipo del individuo. Una parte de estas mutaciones altera el sitio que es reconocido por nucleasas de restricción (enzimas que cortan el ADN en secuencias de nucleótidos precisas) produciendo cambios en el tamaño de fragmentos de ADN que se generan cuando se corta con estas enzimas con respecto a un ADN que no posee estas mutaciones. La presencia o ausencia de estos sitios de restricción polimórficos, provee de marcadores que permiten determinar de qué cromosoma (paterno o materno) un gen de particular interés es derivado, proporcionando una marca para seguir la herencia de un segmento cromosomal dentro de una familia (polimorfismo del largo de fragmentos de restricción o RFLP como es su abreviación en inglés). El análisis por medio de rADN está siendo aplicado para: a) conocer el tipo de mutación cuando un gen ya identificado la presenta, b) conocer defectos genéticos donde el gen mutante no es conocido y c) realizar un diagnóstico prenatal de enfermedades y diagnóstico presintomático de individuos con riesgo. A la fecha, al menos 12 diferentes entidades clínicas son diagnosticadas prenatalmente usando rADN.

Ahora bien, estos principios tecnológicos pueden ser aplicados a otros problemas clínicos. Supongamos que se ha establecido la presencia de un gen particular asociado específicamente, o sea el causante de una patología crónica, como pudiera ser la artritis reumatoidea. El clínico podría establecer —usando estos procedimientos— si un paciente determinado padece de la enfermedad o si la podría padecer en el futuro, necesitaría tomar una biopsia de piel o una muestra de sangre, aislar el ADN, cortarlo, separarlo y determinar si en el material genético está presente o no el gen en cuestión que se asocia a la patología estudiada. Otras áreas donde su uso es una realidad, son el diagnóstico de enfermedades hereditarias, cáncer, diagnóstico histo-patológico, enfermedades infecciosas.

LA REALIDAD

¿Estos procedimientos son una realidad o tan sólo un buen deseo de poder aplicarlos? Sí, lo son. Su principal utilización en diferentes

partes del mundo—incluyendo Chile— es en el análisis epidemiológico de enfermedades infecciosas. Se maneja, a lo menos, un gen específico para cada uno de los tipos de diarrea originadas por *E. Coli* enteropatógenos. No son usados en diagnóstico rápido, porque la clínica de estos pacientes necesita de decisiones médicas en pocas horas, generalmente menos de 24. Sin embargo, se trabaja activamente en agentes cuya clínica nos da más tiempo antes de iniciar el tratamiento, como lo son *Salmonella typhi*, *Campylobacter*, etc.

Otras patologías donde también son utilizados, son las enfermedades virales: citomegalovirus, hepatitis B, Epstein-Barr, etc., siendo utilizados como una alternativa diagnóstica al uso de anticuerpos y cultivo celular.

¿Por qué su uso es aún limitado?

Las razones que tenemos son varias: 1) por un lado, el tener aislado un gen y reproducirlo requiere de un conocimiento y manejo de técnicas de biología molecular que, esencialmente, manejan los investigadores de ciencias básicas;

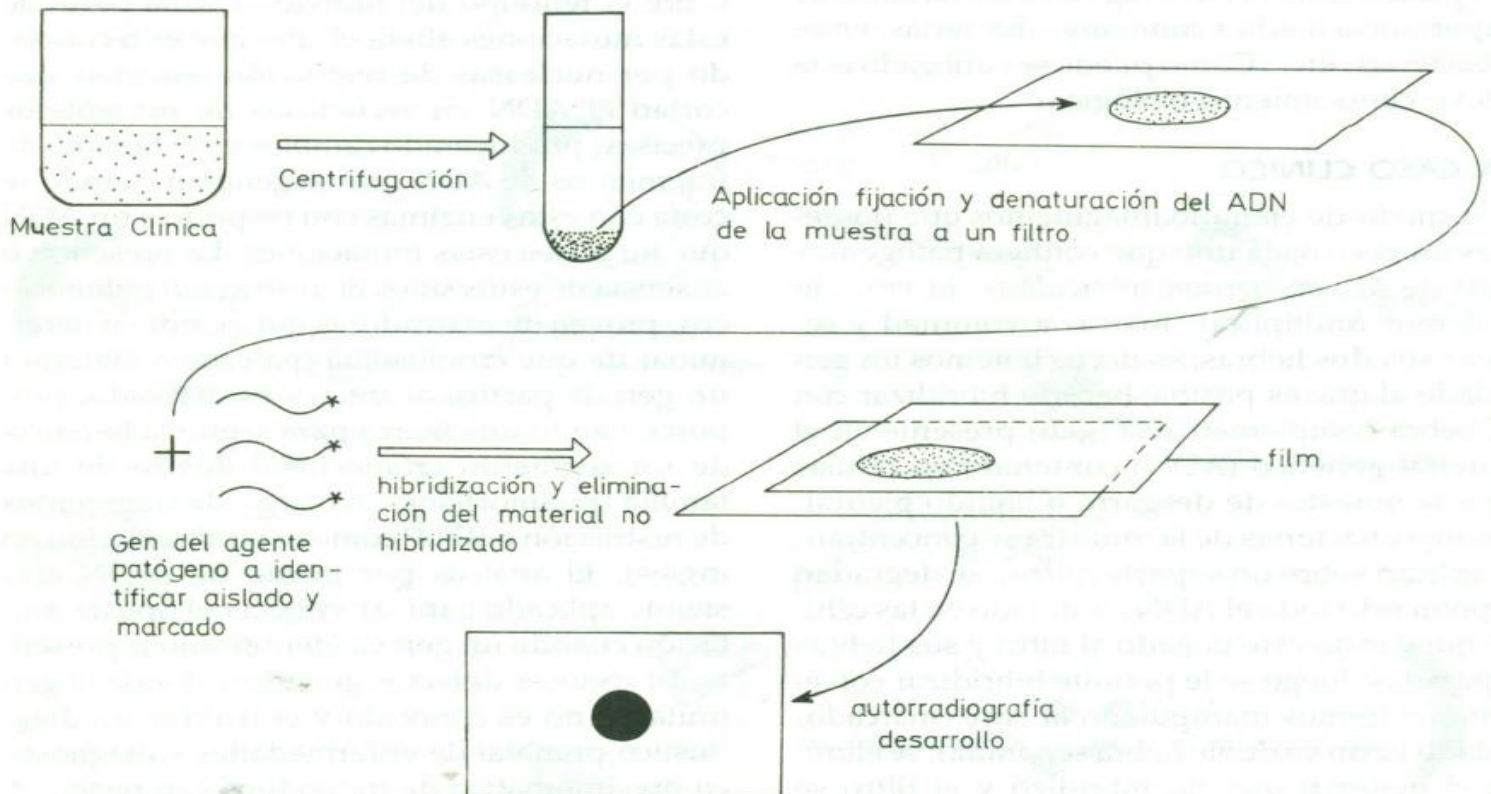


FIGURA 2. Procedimiento para la identificación de un agente patógeno.

2) el costo inicial de trabajar con esta tecnología es elevado; 3) los genes disponibles han sido obtenidos porque el interés ha estado radicado en conocer los mecanismos biológicos que los regulan y porque los científicos han querido responder preguntas netamente biológicas; 4) uno de los aspectos donde es muy útil el uso de esta tecnología es en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Países desarrollados no poseen este problema en el grado que nuestro país —por ejemplo— lo tiene y cuando lo tienen son agentes infecciosos no relevantes a nuestra situación; esto ha llevado el desarrollo de la tecnología orientada a sus problemas particulares que, por desgracia, no siempre coinciden con los nuestros.

FUTURO

El desarrollo de estos procedimientos y su uso en la clínica, es un proceso que ha comenzado y en el cual no deberíamos quedarnos atrás. Me he referido al rADN pero hay otros conocimientos derivados del avance de la biología que son de utilidad del clínico, como son los anticuerpos mononucleares. La evolución de estas tecnologías hacia problemas definidos depende de la fluida interacción entre clínicos y básicos en el bien entendido de querer responder preguntas de mutuo interés; de entender que poseemos problemas médicos que nos son propios y que debemos atacarlos y resolverlos nosotros, aprovechando la potencialidad existente y que se está desarrollando en nuestro país.

UN DESEO

Estos procedimientos no van ni deberían reemplazar al médico en su quehacer con el paciente, sólo pretenden que su capacidad de llegar a un diagnóstico más rápido y preciso se acreciente, pero como siempre, será él con el

enfermo enfrente el que hará un uso criterioso del nuevo conocimiento que se le pone a su disposición. □

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Lewin, B.: Genes III. New York, John Wiley & Sons, 1987.
2. Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D.: Molecular biology of the cell. New York, Garland Publishing Inc., 1983.
3. Francomano, C.A.; Kazazian Jr., H.H.: DNA analysis in genetic disorders. Ann. Rev. Med. 37:377-395, 1986.
4. Highfield, P.E.; Dougan, G.: DNA probes for microbial diagnosis. Med. Lab. Sci. 42:352-360, 1985.
5. Young, R.A. et al.: Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:2583-2587, 1985.
6. Avery, O.T.; McLeod, C.M.; McCarty, M.: Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types; induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. J. Exp. Med. 79:137-141, 1944.
7. Watson, J.D.; Crick, F.H.C.: A structure for desoxyribose nucleic acids. Nature 171:737, 1953.
8. Grunstein, M.; Hogness, D.S.: Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72:3961-3965, 1975.
9. Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517, 1975.
10. Rigby, P.W.J. et al.: Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113:237-251, 1977.
11. Moseley, S.L. et al.: Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* by DNA colony hybridization. J. Infect. Dis. 142:892-898, 1980.

