

El desarrollo de la biotecnología biomédica

Hugo A. Barrera-Saldaña*

Los orígenes de la biotecnología

La biotecnología biomédica tiene su origen en 1976, cuando una versión sintetizada químicamente del gen de la somatostatina, un péptido neurotransmisor de 14 residuos aminoácidos, fue introducido por técnicas de recombinación de ácidos nucleicos a *Escherichia coli* en un vector plasmídico de expresión. A ésta le siguieron en 1979, la insulina y la hormona del crecimiento. Estas demostraciones de la factibilidad de producir proteínas de importancia biomédica, han propiciado el desarrollo de una nueva y floreciente industria biotecnológica que aporta ya varios productos comerciales.

Dos han sido las principales estrategias que se han seguido para construir los plásmidos quiméricos expresores de proteínas de importancia comercial. Mientras que una utiliza la síntesis enzimática del DNA complementario (DNAC) al ARNm de alguna proteína en particular, la otra se apoya en la síntesis química de fragmentos complementarios y traslápados de DNA, que al ensamblarse con la ayuda de la DNA ligasa, se integran, dando lugar a un gen sintético portador de la información necesaria para la síntesis de la proteína en cuestión. También se ha optado por una combinación de ambas estrategias.

Partiendo de cualquiera de estas estrategias, el siguiente paso es incorporar el gen deseado a un vehículo molecular especial, llamado vector de expresión. Este debe incluir secuencias regulatorias provenientes de un gen capaz de dirigir la síntesis

de la proteína codificada por el gen en cuestión, en el sistema celular seleccionado. Dependiendo de la naturaleza del producto (si requiere o no pocas o muchas modificaciones postraduccionales), tradicionalmente se ha seleccionado a bacterias, levaduras y a células en cultivo.

Los sistemas de producción

Dentro de las ventajas de trabajar con bacterias, principalmente *Escherichia coli*, resaltan la simplicidad de su propagación, su velocidad de duplicación, los altos niveles de síntesis del producto y el relativo bajo costo de recuperación del producto; sobre todo tratándose de *Bacillus subtilis* bacteria capaz de secretar el producto al medio de cultivo. En contraste, los problemas que ofrecen estos modelos van desde: 1) faltas en el plegamiento correcto del producto proteico, que entonces se acumula en forma inactiva y como cuerpo de inclusión dentro de la célula, con grandes dificultades para replegarlo correctamente, sobre todo tratándose de proteínas grandes; 2) dificultades asociadas a toxicidad de los propios productos recombinantes sobre las bacterias que se procuran minimizar, controlando lo más estrictamente posible la expresión del gen introducido, la que se difiere para cuando el cultivo haya ya alcanzado el crecimiento deseado; y 3) incapacidad de las enzimas bacterianas para modificar postraduccion-

* ULIEG-Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

nalmente la proteína recombinante, misma que en su fuente celular natural (frecuentemente células de mamíferos), por lo general requiere de tales modificaciones (por ejemplo, fosforilación o glicosilación), para alcanzar su actividad biológica total.

Las levaduras se ubican como sistema entre las bacterias y las células de mamíferos en cultivo: crecen rápido y de forma económica; realizan muchas de las modificaciones postraduccionales típicas de las células superiores, y pueden secretar la proteína recombinante al medio de cultivo. Sin embargo, poseen un alto contenido de proteasas que reducen considerablemente el rendimiento del proceso de producción.

Los cultivos de células de insecto infectadas con baculo virus portadores del gen de interés, alcanzan niveles altos de producción, como se pliegan y se modifican postraducionalmente las proteínas recombinantes, de manera muy similar a como lo hacen las células superiores. Aunque su cultivo es más costoso que el de las bacterias y las levaduras, no lo es tanto comparado con el de las células de mamíferos.

Por último, muchas veces el producir una proteína recombinante de origen humano o de otro organismo superior, precisamente en células en cultivo de mamíferos, no tiene contraparte, sobre todo cuando se trata de proteínas complejas que requieren muchas y muy diversas modificaciones postraduccionales para su acabado final, descartando así a los otros sistemas de expresión.

La primera proteína recombinante comercializada

El primer producto de ingeniería genética que salió al mercado fue la insulina humana recombinante. Dado que la insulina no posee metionina ni triptófano, dentro de los 51 aminoácidos que constituyen sus dos cadenas, fue posible producirla, de tal manera que la estructura de la forma recombinante fuera idéntica a la natural. Esto se consiguió de la siguiente manera: se sintetizaron químicamente dos genes, uno de 63 nucleótidos para la cadena A y otro de 90 nucleótidos para la cadena B de insulina. Cada uno de estos dos genes posee además un codón de iniciación para la traducción al principio y uno de

terminación de la traducción al final. Estos genes sintéticos fueron introducidos, cada uno por separado, en un vector plasmídico que poseía un promotor y la primera parte de un gen bacteriano. Los genes sintéticos fueron introducidos, cada uno por separado, justo enseguida de estas secuencias, de tal manera que se aseguró la síntesis de cadenas polipeptídicas híbridas entre secuencias bacterianas y las de las cadenas de la insulina. Se optó por esta estrategia de proteína híbrida para aumentar la estabilidad de las pequeñas e inestables (en bacterias) cadenas de insulina que eran sintetizadas por el microorganismo. Además, en las proteínas híbridas, la porción que correspondía a la proteína bacteriana estaba separada de la proteína humana por un residuo único de metionina. Al introducir estos plásmidos a *Escherichia coli*, se generaron las proteínas híbridas que contenían las cadenas A y B. Estas se purificaron y al tratarlas con bromuro de cianógeno, que ataca los residuos de metionina y triptófano, se liberaron las cadenas de insulina. Las dos cadenas fueron después combinadas para producir insulina biológicamente activa. La figura 1 esquematiza esta estrategia simple, que resultó efectiva en la producción de insulina humana recombinante.

Ejemplos representativos de la nueva biotecnología

a) Producción de albúmina sérica humana en levaduras

El éxito de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para ofrecer un proceso comercial para la producción de albúmina sérica humana (HSA), radica en que además de ser un organismo no patógeno adecuado para la fermentación industrial, es un organismo que secreta relativamente pocas proteínas al medio, que además de contaminar pudieran degradar proteolíticamente al producto; pero sobre todo, se debe también a su capacidad de secretar grandes cantidades de proteínas recombinantes correctamente procesadas al medio de cultivo. Esto asegura que la albúmina recombinante, polipéptido de 585 aminoácidos que posee 17 puentes disulfuro, obtiene en la fase acuosa su configuración tridimensional correcta.

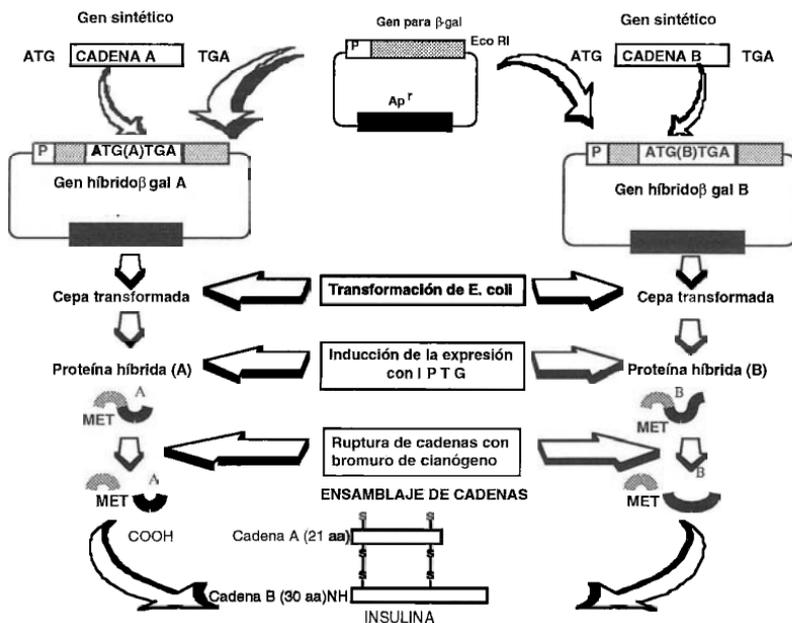


Figura 1. Clonación y expresión en bacterias del gen de la insulina humana. Aquí se muestra la estrategia que consiste en la síntesis por separado de ambas cadenas de la insulina. β -gal = beta galactosidasa; P = promotor; ATG = codón de iniciación; TGA = codón de terminación; Ap = gen de resistencia a la ampicilina; A = cadena A de insulina; B = cadena B de insulina; MET = metionina.

La forma madura de HSA se inicia (extremo amino terminal) con los aminoácidos Asp-Ala-His, por lo que frente a los codones para estos aminoácidos en el DNAC para la HSA, de aproximadamente 1.8 kilopares de bases (kbp), se adaptó un fragmento sintético de DNA bicatenario que codifica una secuencia guía funcional en la levadura.

El gen resultante de la fusión fue insertado en un vector de expresión, basado en un plásmido transbordador capaz de propagarse en *Escherichia coli* y funcionar en la levadura, cuya estructura general incluye: marcadores para la selección en ambos microorganismos, orígenes de replicación también para ambos microorganismos y un conjunto de elementos de control que favorecen la expresión del gen deseado en las levaduras.

El plásmido recombinante se introdujo en una cepa de levadura productora de la proteasa procesadora de la secuencia guía. En el sobrenadante de los cultivos pudo observarse que la HSA madura, es el mayor componente protéico. No se observó HSA sin procesar o incompletamente procesada y los niveles de HSA madura alcanzaron los 50 mg/l en el sobrenadante del cultivo.

b) Eritropoietina humana producida en cultivo celular

La eritropoietina humana (hEPO) es aceptada como uno de los más importantes reguladores fisiológicos del proceso de diferenciación eritroide y controla el mantenimiento de los niveles fisiológi-

cos de la masa circulante de eritrocitos; por tanto, tiene un gran potencial en el tratamiento terapéutico de la anemia. El gen hEPO fue aislado en 1985, a partir de un banco de genes humanos, usando como sonda mezclas de oligonucleótidos sintetizados, a partir de la secuencia parcial, generada con la ayuda de un equipo automatizado de microsecuenciación, de la eritropoyetina urinaria humana. El gen hEPO resultó ser de 4.8 kbp y consta de cinco exones que codifican una glicoproteína de 193 aminoácidos. Los primeros 27 de éstos corresponden a la secuencia guía para la secreción. Para su expresión, el gen se insertó, desde la región 5' no-traducible hasta la región 3' no-traducible, en un vector donde quedó bajo el control del promotor tardío del virus 40 de simio (SV40) (ver figura 2). Además, el vector seleccionado también porta una unidad de expresión de la dihidrofolato reductasa (DHFR), que permitió seleccionar clonas transformadas, al introducir el plásmido recombinante en una línea de cultivo de células de ovario de hamster chino deficiente en DHFR (CHO DHFR). Una muestra representativa

de 5.5 días del medio acondicionado de las células transfectadas, contenía 18.2 unidades de EPO por ml cuando se midió por radioinmunoensayo, y se detectaron valores similares a 16 unidades de actividad por ml, cuando a la muestra se le practicaron ensayos *in vitro* (efecto sobre cultivos de médula ósea de rata) e *in vivo* (efecto sobre ratones exhipóxicos policitémicos). La casi coincidencia de los resultados de estos tres ensayos demuestra que la EPO es completamente activa biológicamente.

c). Borregas transgénicas productoras en su leche de factor IX de la coagulación

Un animal transgénico es aquel cuyo patrimonio genético está constituido por su genoma, naturalmente heredado, más uno o varios genes introducidos artificialmente al genoma de todas sus células (incluyendo la línea germinal).

El procedimiento que ha dado los mejores resultados en la obtención de animales transgénicos

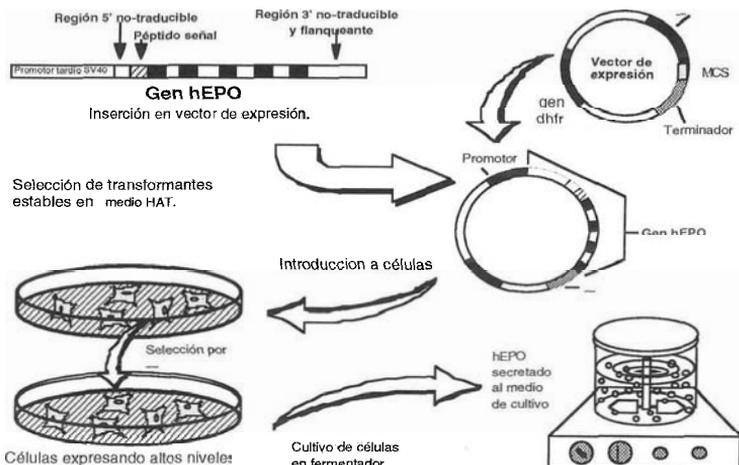


Figura 2. Síntesis de eritropoyetina humana en cultivo celular. Se esquematiza la estrategia seguida para introducir, expresar y lograr la sobreexpresión de eritropoyetina humana en células de mamífero cultivadas en el laboratorio.

cos, consiste en la microinyección del gen deseado en el interior del pronúcleo masculino (por ser generalmente mayor que el femenino) de ovocitos recién fertilizados. Al implantar estos ovocitos en el oviducto de madres sustitutas, un cierto número de ellos se desarrolla y da origen a individuos. En los que el gen o genes transferidos (transgenes) se encuentran incorporados al genoma nuclear de todas sus células. De acuerdo con la naturaleza de las secuencias regulatorias que lo flanquean, se determinará el tipo de células, tejido u órgano, y la etapa de la vida del animal en que se expresará el transgén.

Es posible dirigir la síntesis de una proteína, producto de un transgén particular, hacia un tejido corporal específico del animal transgénico, si se combinan los elementos genéticos regulatorios de un gen específicamente expresado en el tejido deseado, con las secuencias codificantes del gen para la proteína deseada. Se considera la glándula mamaria como el órgano más adecuado para

estos propósitos, lo que se logra tal y como se ilustra en la figura 3.

Se escogió al gen ovino de la β -lactoglobulina (oBLG), que codifica una proteína de la leche, para derivar los elementos genéticos necesarios para producir en la leche al factor IX de la coagulación sanguínea (FIX), que normalmente es sintetizado en el hígado y sufre muchas modificaciones post-traduccionales previas a su secreción. Dado que se desconoce la organización precisa de los elementos genéticos que en el gen oBLG dictan la expresión específica en la glándula mamaria, se optó por construir una fusión de este gen con el DNAc del FIX. En dicha fusión, las secuencias nucleotídicas codificantes para la proteína FIX, reemplazaron a las de la β -lactoglobulina.

El gen quimérico se microinyectó en el pronúcleo de cigotos unicelulares de ovinos, lográndose generar cuatro animales transgénicos; dos machos y dos hembras. Se estudiaron las hembras, las cuales portaban alrededor de 10 copias por

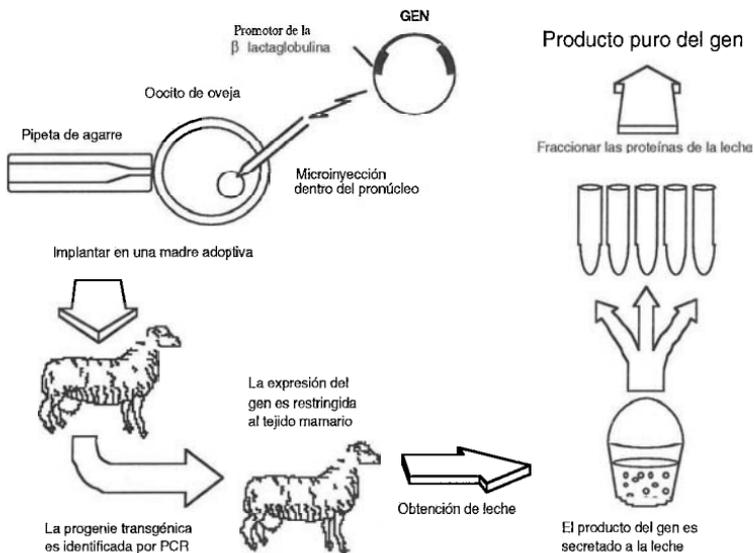


Figura 3. Producción del factor IX de origen humano en animales transgénicos. Se ilustran los pasos seguidos para generar borregos transgénicos en cuya leche se produce el factor IX de la coagulación sanguínea, de origen humano

célula del gen quimérico cada una; éstas fueron apareadas por separado y cada una dio nacimiento a un cordero, los cuales también heredaron el transgén quimérico BLG-FIX. Durante la lactancia se colectó leche de cada oveja madre, y ésta se analizó para determinar la presencia de FIX de origen humano. Este se detectó por radioinmunoanálisis en la leche de ambas hembras, aunque a muy bajos niveles; aproximadamente 25 ng/ml, es decir, alrededor de 250 veces menos que la concentración normal del plasma humano. Es de esperar que el refinamiento de las manipulaciones y construcciones genéticas requeridas para este tipo de sistemas de producción, conduzcan a niveles mayores de producción.

Cuando se logren niveles de eficiencia de expresión comparable para bovinos se estará hablando de producir, a partir de una sola vaca transgénica productora de 5 galones de leche diarios, en el orden de 20g/día de la proteína recombinante de interés.

Biotecnología en Monterrey

Junto con nuestro esfuerzo en el campo del diagnóstico genético molecular, en nuestro laboratorio hemos incursionado también en el área de la biotecnología de hormonas del crecimiento humano y de animales. A la fecha hemos aislado por clonación molecular las dos isoformas del humano, la del cerdo, vaca, caballo, perro y gato; siendo estas tres últimas, contribuciones originales de nuestro grupo. También hemos conseguido expresar algunas de éstas en forma de proteína fusión en *Escherichia coli* y con la de origen humano hemos generado líneas celulares sobreproductoras de tales hormonas biológicamente activas.

Conclusiones

La ingeniería genética permite reprogramar desde bacterias hasta animales y plantas, para convertir éstos en fabricas biológicas, por lo que a las valiosas aportaciones que los microorganismos venían dando a la industria, las plantas a la agricultura y los animales a la ganadería, se suman ahora nuevos beneficios de éstos a la medicina. Con tales avances hemos pasado de la habilidad milenaria de fabricar pan, quesos y vinos, a la de sentar las bases de las nuevas habilidades de manipulación de la herencia de los seres vivos, que marcarán lo cotidiano del siglo que está por iniciarse y que deberán impostergablemente estar acompañadas de una mayor conciencia de nuestra gran deuda con la madre naturaleza.

Agradecimientos

A Raquel Cardiel, por elaborar el manuscrito, a Hugo Gallardo por el diseño gráfico, a mis colaboradores y estudiantes de la ULIEG, por su amistad y esfuerzo aportados, así como a la Facultad de Medicina y a CONACYT por sus diversos apoyos.

Referencias

1. **Barrera Saldaña HA.** 1992. Información Genética: su estructura, función y manipulación. CONACYT, México.
2. **Barrera Saldaña HA.** 1993. Enciclopedia Hematológica Ibero-Americana. Ediciones Universidad de Salamanca, España.
3. **Watson JD, Gilman M., Witkowski J, Zoller M.** Recombinant DNA 2a. Edición, Scientific American Book W. H. Freeman y Compañía Nueva York, 1992.

El desarrollo de la biotecnología biomédica en parasitología. Diagnóstico molecular, vacunas de nueva generación y perspectivas

Salvador Said-Fernández,* Herminia Martínez-Rodríguez,** Ma. del Carmen Sánchez-Guillén***

Resumen

Las enfermedades infecciosas constituyen una de las causas más frecuentes de muerte en los países en desarrollo. De las más importantes son: malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis, giardiasis, amebiasis y esquistosomiasis. Gracias al desarrollo de la biotecnología, se dispone ahora de técnicas de diagnóstico rápidas y específicas para la identificación precisa de los agentes causales de las parasitosis mencionadas. La más conocida y útil de estas técnicas es la de PCR. Las vacunas de nueva generación ofrecen ahora genuina esperanza de control de algunas enfermedades parasitarias. Consisten en la síntesis de copolímeros (cocteles en una sola molécula de varios antígenos naturales). También se han desarrollado vacunas polivalentes, utilizando como vehículos virus o bacterias atenuados o mutantes recombinantes, que portan la información genética para antígenos únicos o múltiples, y que expresan dicha información dentro de organismos inoculados sin peligro para ellos. Por último, es inminente el advenimiento de nuevas técnicas de diagnóstico mediante hibridación *in situ* (FISH), que prometen resultados más rápidos que los ahora obtenidos con PCR y de drogas moleculares (polinucleótidos sintéticos), que posiblemente se constituyan en medicamentos antiparasitarios más potentes y menos tóxicos que los actuales.

Introducción

El propósito de este trabajo no es hacer una revisión exhaustiva sobre biotecnología médica, sino poner en relieve algunos de los trabajos más importantes, en el contexto del desarrollo de la biotecnología al servicio de la medicina, en el campo de la parasitología médica. Para este propósito hemos reunido algunos trabajos originales representativos de esta área del conocimiento biomédico y varias revisiones hechas por especialistas en temas específicos.

Las parasitosis ocasionadas por protozoarios y helmintos, constituyen un importante problema de salud pública en el mundo, sobre todo en los países en desarrollo.

Las biotecnología está contribuyendo activamente con el desarrollo de técnicas rápidas y seguras para el diagnóstico molecular de un número creciente de enfermedades parasitarias y para el desarrollo de vacunas de nueva generación, más seguras, potentes, económicas y fáciles de aplicar; principalmente se está haciendo realidad la vacunación contra protozoarios y gusanos, lo cual hace apenas algunos años era solamente un sueño.

Las perspectivas a corto plazo para el desarrollo de la biotecnología en parasitología médica, consisten en la aparición de nuevas sondas moleculares y antígenos recombinantes para el diagnóstico

* División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Apartado Postal 020E, Administración de Correos No. 4, Monterrey, C.P. 64720, N.L. México.

** Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Calzada Madero, Colonia Mitras Centro, Monterrey, N.L., C.P. 64000

*** Laboratorio de Parasitología, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico de Oriente, 2 Norte 2004, Segundo Piso, Ala Sur, Puebla, Pue.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Doctor Salvador Said-Fernández, Apartado Postal 020E, Administración de Correos No. 4, Monterrey, C.P. 64720, N.L. México.

molecular de más enfermedades parasitarias, y a mediano plazo el desarrollo de una terapia molecular basada fundamentalmente en el uso de nucleótidos sintéticos, para lo cual ya está desarrollada la tecnología básica necesaria, y se tiene la experiencia suficiente con enfermedades virales y bacterianas, así como las producidas por hongos.

Las enfermedades parasitarias con mayor importancia epidemiológica en los países en desarrollo, son las producidas por protozoarios, como: malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis, amibiasis y giardiasis, y las producidas por helmintos, como esquistosomiasis, oncocercosis y cisticercosis.

Para algunas de ellas se han desarrollado las técnicas mencionadas y para otras está en proceso su desarrollo. Enseguida haremos una breve mención sobre las características epidemiológicas sobre las enfermedades que han recibido más atención, desde el punto de vista biotecnológico, en los últimos años.

Malaria

Es causada por protozoarios del género *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*. El primero es el responsable de la mayor morbilidad y mortalidad. La enfermedad es transmitida por varias especies de mosquitos del género *Anopheles*. Se reportan anualmente entre 6 y 11 millones de casos, pero se estima que la incidencia es en realidad diez veces mayor. Tan sólo en África se reportaron más de un millón de muertes por malaria en la década de 1960 a 1970. La malaria es un serio problema en Centro y Suramérica, Asia y África¹. Hace algunos años se pensaba que con el uso de cloroquina y DDT se podría erradicar esta enfermedad, pero los mosquitos desarrollaron resistencia contra el insecticida y la enfermedad repuntó con gran fuerza².

Tripanosomiasis y leishmaniasis

Las leishmanias y tripanosomas son protozoarios que pertenecen a la familia *Trypanosomatidae*³. Los miembros de esta familia están ampliamente distribuidos en la naturaleza, y en general, tienen ciclos de

vida muy complejos que involucran a hospederos vertebrados e invertebrados. Las especies importantes desde el punto de vista médico y económico son las que causan enfermedades al hombre y al ganado.

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas, principalmente en América. Se estima que cada año causa la muerte de 50 mil de los 16 millones de personas que son portadoras del parásito.⁴

Trypanosoma brucei gambiense y *T. brucei rhodesiense* causan en África la enfermedad del sueño.

Varias especies de *Leishmania* infectan al hombre⁵; son los agentes causales de la leishmaniasis. Esta enfermedad está ampliamente distribuida en los trópicos. Existe una forma cutánea y otra visceral de leishmaniasis. La visceral es mortal si no se trata con oportunidad.⁵

Amibiasis

Esta enfermedad es causada por el protozoario *Entamoeba histolytica*. Se caracteriza por la destrucción de tejidos en las zonas invadidas por los parásitos. Las dos formas clínicas más frecuentes son la intestinal y la hepática.

Se calcula que el 10% de la población mundial está infectada, pero sólo 1 de cada cada 10 individuos infectados muestra síntomas. Se acepta que hay dos especies indistinguibles desde el punto de vista morfológico que parasitan el intestino del hombre, *E. histolytica*, patógena y *E. dispar*, no patógena.⁶

En la actualidad, existe una variedad de técnicas de laboratorio para demostrar la presencia de los parásitos o de sus antígenos, o de los anticuerpos dirigidos contra éstos en el organismo afectado, los cuales permiten al médico corroborar su diagnóstico de amibiasis, apoyado inicialmente en los síntomas e imágenes radiológicas. La mayor parte de estos métodos se basan en el uso de inmunorreactivos. Actualmente la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituye una excelente alternativa para efectuar diagnósticos rápidos y precisos de amibiasis⁶. Aún no existe vacuna pero su desarrollo está en un grado considerable de avance.⁷

Babesiosis

El género *Babesia* comprende a más de 100 especies patógenas transmitidas por garrapatas a una amplia variedad de huéspedes vertebrados. En Estados Unidos y en Europa dos especies parecen ser responsables de prácticamente todos los casos en la especie humana. Estas son, respectivamente, *Babesia microti* y *B. divergens*. En el ganado bovino, en las zonas tropicales húmedas, *B. bovis* y *B. bigemina*, transmitidas por garrapatas del género *Boophilus*, son causantes de cuantiosas pérdidas, sobre todo en ganado bovino⁸.

El diagnóstico definitivo de babesiosis se basa en la demostración de anticuerpos específicos y la observación de las inclusiones intraeritrocíticas características en frotis teñidos con Geimsa. Sin embargo, en los primeros estadios de la enfermedad es difícil observar a los parásitos porque están presente en unas cuantas células. El diagnóstico molecular de *Babesia* ayuda considerablemente a resolver este problema.⁹

Giardiasis

Es producida por el protozoo parásito *Giardia lamblia*, que habita en el intestino humano y en el de otros mamíferos. Este parásito es la principal causa de diarrea en países desarrollados y con un menor desarrollo. En Los Estados Unidos de Norteamérica se registra una incidencia relativamente alta en niños y pacientes inmunocomprometidos. No son infrecuentes las epidemias debidas al uso de aguas contaminadas. El diagnóstico de giardiasis se basa en la identificación de quistes en heces. La detección de anticuerpos tiene alguna utilidad, sobre todo con técnicas de inmunofluorescencia. Las principales dificultades para estas técnicas clásicas de diagnóstico consisten en que la eliminación de quistes es errática y por lo tanto el diagnóstico es difícil de establecer con un solo análisis. Actualmente están disponibles algunas sondas específicas para el diagnóstico molecular de *G. lamblia* (ver ref. 9).

Diagnóstico molecular

Reacción de polimerización en cadena: PCR

PCR (*Polymerase Chain Reaction*), en español: reacción en cadena de la polimerasa. Se ha difundido muy ampliamente por su enorme sensibilidad y alta especificidad. Su creador, el doctor Kary Mullis, por este procedimiento se hizo acreedor al Premio Nobel en 1993.

La técnica de PCR permite hacer un diagnóstico con muy pocas copias del genoma de la especie o estirpe celular de interés, y en algunos casos hasta con una sola copia. La técnica consiste en colocar en el tubo de reacción una muestra biológica que contenga presumiblemente el genoma de la célula que se desea identificar, y ésta se incuba con la enzima Taq polimerasa (*Thermus aquaticus polymerase*, DNA polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus*), que puede funcionar a temperaturas relativamente altas. Esta enzima, en unas horas fabricará millones de copias de un gen o región génica particular, perteneciente al genoma de interés en una mezcla de reacción con las condiciones y los nucleótidos adecuados, después de unos 30 ciclos de calentamiento a 95° C y enfriamientos sucesivos a 56° C y 72° C. En estas condiciones suceden consecutivamente los siguientes sucesos: separación de las dos cadenas de DNA, apareamiento del par de oligonucleótidos que flanquean al DNA blanco, alargamiento de las nuevas cadenas complementarias al DNA blanco, iniciando a partir de los oligonucleótidos, por acción de la Taq polimerasa.¹⁰

Existe una enorme lista de enfermedades que pueden ser diagnosticadas por PCR y cada día aumenta, estas enfermedades pueden ser virales, bacterianas, producidas por protozoarios, de origen genético o tumorales.

Se han construido sondas y descrito con detalle las técnicas para la detección de las siguientes especies de parásitos: *T. cruzi*⁵, *T. brucei*⁵, *T. congolense*⁵, *T. vivax*⁵, *T. simiae*⁵, *Leishmania*⁵, *L. braziliensis*¹¹, *Plasmodium falciparum*¹, *P. ovale*¹, *P. vivax*¹, *P. malariae*¹, *E. histolytica*⁸, *E. dispar*⁸, *Babesia microti*⁸ y *Giardia lamblia*⁹.

Hibridación

Existen fundamentalmente tres modalidades: la clásica en líquido, la que se desarrolla en filtros y la que se practica *in situ* directamente sobre las células.

El genoma de los parásitos, amplificado por PCR, puede hibridarse *in vitro* (*Southern hybridization*) con las sondas específicas y detectarse por quimioluminiscencia, con el fin de confirmar el diagnóstico. Se han descrito, por ejemplo, técnicas de hibridación *in vitro* para *Plasmodium sp.*¹ y *Babesia microti*².

Hibridación in situ, *FISH* (Fluorescent In Situ Hybridation)

Esta es una de las técnicas de diagnóstico más recientemente aportadas por la Biología Molecular, la cual ofrece excelentes posibilidades. El fundamento de *FISH* es el mismo que el de la técnica de hibridación en filtro, sólo que aquí se visualizan los cromosomas ílesos y en su sitio, completos o parte de ellos, y hasta con tres marcadores fluorescentes simultáneos, cada uno con un color diferente. Con esta técnica es posible, por ejemplo, conocer el sexo de un feto analizando sus células descamadas presentes en el líquido amniótico, porque es posible ver el cromosoma X emitiendo fluorescencia en un color y el Y en otro color, en la misma preparación (cf. refs. 12 y 13).

La aplicación de *FISH* para diagnóstico de parásitos se logró muy recientemente para *L. braziliensis*, utilizando una sonda específica, en el laboratorio de Citometría Molecular, de la Escuela de Medicina, en la Universidad de California. En breve se piensa ampliar el número de sondas para diagnóstico de otros parásitos con importancia médica, *Plasmodium* y *Trypanosoma* (doctor Curtis Thompson, comunicación personal). Esta nueva técnica tiene la ventaja de no requerir amplificación previa. Puede hacerse el diagnóstico de inmediato en la muestra fresca.

Serodiagnóstico con antígenos recombinantes

Ahora es posible introducir en una bacteria o levadura genes de virus, bacterias, protozoarios,

helmintos, humanos o de animales en un vehículo molecular que permita la producción en virus o bacterias de proteínas de interés médico, como la insulina, para controlar la diabetes, la hormona del crecimiento humano o antígenos únicos o combinados con epítomos de diferentes proteínas (ver ref. 14). Estos antígenos recombinantes pueden usarse como vacunas o como inmunoreactivos para serodiagnóstico (Cuadros I y II).

Cuadro I. Proteínas recombinantes para el diagnóstico de amibiasis

Nombre de la proteína recombinante	Método de ensayo y características	Referencia
recM17, 125 kDa	12% divergencias entre ZP y ZNP ^a	28
	ELISA y Western-blot en suero de pacientes con AHA ^b	29
recSREHP	Western-blot en suero de pacientes con AHA	15
	ELISA, 79% sensibilidad	30
	87% especificidad	
recEHP1, 125 kDa	33 casos positivos	31

^a ZP, Zimodemos patógenos; ZNP, zimodemos no patógenos
^b AHA, absceso hepático amibiano

Cuadro II. Desarrollo de vacunas contra la malaria

Tipo de vacuna	Características	Referencia
Copolímero SP166	Antígeno sintético Eficacia del 38.8% en pruebas de campo Niños 14 años 77%	19
Copolímero 35,55 y 83 Kd	Antígeno sintético contra esporozoítos de <i>P. falciparum</i> Pruebas de campo realizadas	32
Vectores vivos recombinantes copolímeros nuevos adyuvantes	Dirigidas contra varios estadios del ciclo vital de los parásitos	14
Vectores vivos recombinantes	Vehículo portador del gene del antígeno Pfs230	33

Las proteínas recombinantes son inmunorreactivos definidos, que producen resultados más confiables que los que se obtienen con los extractos crudos que se han usado por muchos años para serodiagnóstico de diversas parasitosis. Por otro lado, las proteínas recombinantes pueden producirse en grandes cantidades sin necesidad de cultivar a los parásitos, que generalmente producen *in vitro* menos biomasa y requieren más tiempo para crecer que las bacterias o las levaduras recombinantes. En algunos casos es posible incluso hacer diagnósticos muy específicos. Por ejemplo ahora es posible establecer diagnósticos de amibiasis invasora de hígado, utilizando este tipo de biorreactivos¹⁵.

Vacunas

La tecnología moderna está haciendo posible el desarrollo de vacunas llamadas de nueva generación (Para un análisis extensivo de este ver ref. 16).

Bloom¹⁶, en 1989 expresó lo siguiente: "la inmunización es el arma más efectiva y económica para la prevención de las enfermedades en los países en desarrollo. Por eso es muy importante poner al alcance de los países más pobres del mundo, los avances de las ciencias biomédicas modernas. En esos países millones de personas están enfermas porque son de escasos recursos y se empobrecen más porque están enfermas".

Hay enfermedades para cuyo control aún no hay vacunas disponibles y vacunas ya existentes que tienen muchas limitaciones para su aplicación.

Idealmente un vacuna nueva o mejorada debería reunir las siguientes características:¹⁶

- 1) Barata
- 2) Segura
- 3) Muy efectiva (inducir 90% al 100% de protección)
- 4) Termestable (evitando las cadenas frías que son costosas y de alto riesgo)
- 5) Requerir una sola aplicación o ser compatibles con el programa de aplicación de otras vacunas
- 6) Fáciles de administrar y aplicables lo más cercanamente posible al nacimiento.
- 7) Inducir inmunidad de por vida.

Existen 4 tipos básicos de vacunas, cada una de ellas tiene ventajas y limitaciones para su uso:¹⁶

1) Vacunas clásicas producidas con microorganismos muertos

Ventajas: son las más simples y baratas. Contienen muchos antígenos y prácticamente a todos los receptores aseguran una respuesta positiva.

Desventajas: siempre existe la peligrosa posibilidad de que contengan organismos vivos, virulentos y algunas de ellas ofrecen reacciones indeseables.

2) Vacunas clásicas producidas con microorganismos vivos atenuados

Ventajas: son baratas, inducen una inmunidad persistente y tienen buenos índices de seguridad.

Desventajas: los microorganismos utilizados para su elaboración pueden revertir hacia la virulencia o aun atenuados, pueden ser patógenos para individuos inmunodeprimidos.

3) Vacunas modernas moleculares (subunit vaccines)

Se preparan a partir de componentes moleculares individuales de un agente patógeno, mediante síntesis química o se producen en microorganismos recombinantes, por ejemplo los toxoides de tétanos y difteria.

Ventajas: son definidas desde el punto de vista químico, hay reproducibilidad en cuanto a sus preparación y su ensayo, usualmente son baratas.

Limitación: los carbohidratos son antígenos muy importantes que no pueden producirse por ahora con las técnicas existentes, lo más que se ha logrado es producir glucoproteínas en levaduras y células de mamífero y de insectos. Existen por ejemplo glicoproteínas que inducen inmunidad protectora contra *Hemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*, que causan meningitis, retardo mental y neumonía.

Un inconveniente del posible uso de pequeños epitopos en vacunas moleculares, consiste en que

se estarían generando anticuerpos policlonales contra un solo epitopo y podrían no neutralizar a los organismos mutantes. Por lo tanto, deberían crearse vacunas a base de múltiples epitopos.

Una desventaja común para las vacunas con microorganismos muertos y para las vacunas moleculares es que se necesitan aplicar varios refuerzos para obtener un porcentaje de protección aceptable.

4) Vacunas modernas anti-idiotipo

Se basan en que los sitios activos de los anticuerpos (idiotipos) son complementarios al determinante antigénico específico. Algunos anticuerpos dirigidos contra el sitio activo de un anticuerpo en particular pueden mimetizar al antígeno.

Aunque se ha logrado la inmunización en algunos sistemas experimentales con vacunas anti-idiotipo o anti-anticuerpo se ha tenido gran dificultad en lograr altos niveles de inmunización y memoria inmunológica. Todavía están por definirse los casos en que serán útiles estos tipos de vacunas. Una posible aplicación de este tipo de vacunas sería el tratamiento contra enfermedades autoinmunes.

Vacunas de nueva generación¹⁶

Aprovechando las ventajas de los cuatro tipos básicos de vacunas mencionados, se pretende desarrollar, mediante ingeniería genética, vectores moleculares que sean capaces de inmunizar contra antígenos múltiples.

Para el desarrollo de vehículos multivacunas se están usando dos estrategias básicas: una con virus y la otra con bacterias recombinantes (Cuadros II y III).

Las vacunas elaboradas con virus presentan las siguientes ventajas:

- expresan antígenos en células eucarióticas.
- poseen varias características fundamentales de los antígenos naturales: procesamiento proteolítico, glicosilación, plegamiento, secreción y ensamblaje de subunidades. Estos antígenos pueden estimular la proliferación de linfocitos T citotóxicos y la producción de anticuerpos.

Cuadro III. Algunas contribuciones para el desarrollo de vacunas contra otras enfermedades parasitarias

Enfermedad	Contribución	Referencia
Amibiasis	Expresión de un fragmento de una proteína de <i>E. histolytica</i> rica en serina (SREHP) en una cepa vacunal de <i>Salmonella typhimurium</i> (3987). Se infectaron <i>gerbils</i> con la cepa recombinante	34
	Antígeno natural purificado adhesina galactosaespecífica de <i>E. histolytica</i> indujo inmunidad protectora contra el reto con amibas inoculadas intrahepáticamente en <i>gerbils</i>	7
Esquistosomiasis	Una enzima recombinante de <i>Schistosoma</i> (glutathion transferasa; SM28GST), expresada en varios vectores y utilizada para inmunizar animales redujo en un 90% la fertilidad de los huevos del parásito en los hospederos.	35

Las vacunas bacterianas tienen la habilidad especial de inducir inmunidad local (por ejemplo en el intestino) e inmunidad mediada por células.

De las ideas anteriores han surgido dos tipos de vacunas de nueva generación: Vacunas con virus vivos atenuados usados como vehículos. Vacunas de bacterias atenuadas usadas como vehículos.

Vacunas con virus vivos atenuados usados como vehículos

La viruela fue erradicada mediante el uso de cepas vivas atenuadas del virus de *vaccinia* (viruela bovina), derivada originalmente por Jenner.

El virus *vaccinia* de Jenner es de doble cadena de DNA y tiene aproximadamente 185 mil pares de bases. Contiene toda la información para su propia transcripción y replicación en una amplia variedad de células hospedadoras. Su genoma tiene 25 mil pares de bases que no son indispensables para el virus.

Cuadro IV. Sondas moleculares y métodos de ensayo para la identificación de cepas patógenas y no patógenas de *Entamoeba histolytica*

Tipo de sonda	Características y nombre de las sondas	Método de ensayo	Referencia
cDNA	pEH2, pEH5, pEH11 y pEH12	Distingue E. h ^b entre E. h ^b y otras especies de amibas en heces humanas. Dotblot	36
	Sondas de Samuelson (ref.36)	Distinguen entre ZP y ZNP 98% específica 96% sensible PCR, DNA de heces 201 aislados	37
cDNA	cEHP1, cEHNP1	2% diverg. ZP/ZNP HMI:IMSS/SAW 760 en 36 aislados Southernblot PCR (12 mtras.)	38 y 39
cDNA	lambdaM17	1% var. aislados patógenos, 12% var. con otras secuencias Westernblot	28
cDNA	clona 0.7 kb	Distingue entre ZP y ZNP clona amplificada hibridada con HM1 y SAW 142. DNA de 19 mtras. abscesos. 100% especificidad PCR	40 y 41
cDNA	C2	Distingue dif. entre Eh ^a y otras	42
DNA	P145 y B133	Distingue entre ZP y ZNP	43
DNA	Genes que codifican para RNAr	Distingue entre ZP y ZNP usando DNA tratado con enzimas de restricción.	44

^aEh, *Entamoeba histolytica*,

^bZP y ZNP, zimodemos patógenos y no patógenos, respectivamente.

^cEh, cepas de amibas de la especie *Entamoeba histolytica*.

La estrategia para hacer de este virus un vehículo multivacuna se basa en reemplazar el material genético no indispensable por los genes que codifican para los antígenos deseados, cuya expresión sea regulada por el sistema de promotores de transcripción del virus *vaccinia*. Estos se logró como sigue: primero se construyeron plásmidos que contienen uno o más promotores y sitios de clonación para introducir secuencias de DNA que codifican para los antígenos exógenos (foreign), y un marcador de selección. Todos flanqueados por secuencias del DNA que complementan secuencias de DNA no esencial del virus.¹⁷

Después este plásmido se introdujo en células de una línea susceptible a la infección por el virus *vaccinia*, y luego estas mismas células se infectaron con el virus. En las que, con muy baja frecuencia, ocurrió una doble recombinación entre las secuencias que flanquean al DNA foráneo. El resultado fue el reemplazo preciso de las secuencias del DNA viral por el promotor y el gen del antígeno foráneo deseado.¹⁷

En esa forma se han expresado una amplia variedad de antígenos de protozoarios, bacterias y virus y se han logrado expresar hasta cuatro antígenos diferentes en un solo virus recombinante.¹⁶

La principal desventaja del uso como vacuna del virus *vaccinia* como vehículo, es que aunque con una frecuencia muy baja, este virus es capaz de producir severas complicaciones neurológicas y cuadros de infección diseminada y grangrenosa. Sin embargo, es posible identificar y eliminar del genoma viral, los genes responsables de estos efectos indeseables. También es posible incorporar en el genoma del virus genes de interleucina-2 para incrementar la respuesta inmunológica, contra el antígeno foráneo y contra el virus mismo.

Debido a que los receptores producen anticuerpos neutralizantes contra el virus, una segunda limitación para este tipo de vacunas consiste en que no es posible aplicar refuerzos, al menos a corto plazo, porque al revacunar, el virus sería neutralizado inmediatamente; por lo tanto, la vacuna tiene que ser muy efectiva en una sola aplicación para que sea útil.

Además del virus *vaccinia* se han usado otros virus recombinantes como vacunas: de DNA, Adenovirus tipos 4 y 7, no atenuados, pero administrados por vía oral, para prevenir enfermedades

respiratorias. Herpes virus, con ventajas moleculares similares a las del virus *vaccinia*. Los virus de RNA utilizados son el virus atenuado de la poliomielitis y el virus de la fiebre amarilla, el cual ofrece ventajas por su inocuidad¹⁶.

Vacunas bacterianas recombinantes

Una cepa de *Salmonella typhi* (TY21a) se eligió para diseñar una bomba de tiempo. Esta cepa es una mutante deficiente en galactosa epimerasa (GalE). No puede convertir UDPgalactosa en UDPglucosa. Esta cepa, administrada oralmente puede colonizar el intestino e inducir inmunidad secretoria. La bacteria puede crecer por varios días, hasta que se acumula más UDPglucosa de la que puede soportar. Entonces muere y libera los antígenos. Esta vacuna ha demostrado ser notablemente segura y estable. Se ha probado con buenos resultados contra la fiebre tifoidea en Egipto y Chile.

Desventajas: no es posible saber qué gen se modificó cuando se introducen genes de antígenos exógenos y se requieren 3 tomas para inducir una inmunidad relativamente baja (67%).¹⁶

Como un fuerte apoyo para incrementar las ventajas de esta nuevas vacunas, la industria farmacéutica ha conseguido la aprobación, para uso humano, del uso de polímeros de ácido láctico y ac. glicólico (PLA/PGA) que funcionan en el organismo como microbombas que permiten liberación controlada de los antígenos, drogas u hormonas. Esta liberación puede ser continua, por varios meses, o en pulsos, cada 4 a 8 semanas.

También se dispone de superadyuvantes que estimulan respuestas inmunológicas más potentes que los adyuvantes clásicos.^{14 y 16}

Prácticamente todas las formas antes mencionadas se han usado experimentalmente para desarrollar vacunas contra parásitos de los géneros *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Entamoeba*, *Babesia* y *Esquistosoma* (Cuadros II y III). Las investigaciones sobre la vacuna contra la malaria han sido particularmente intensas. Se están probando a nivel experimental diseños de vacunas clásicas, modernas y de nueva generación, incluyendo modalidades muy novedosas, como el uso de antígenos ciclizados. Estas vacunas han sido usadas en humanos y consisten en un antígeno

sintético de *P. falciparum* que está acoplado al toxoide de tétanos y a un tetrapéptido llamado (NANP)₃ (Asn-Ala-Asn-Pro) y ciclizado. El péptido lineal, aplicado en humanos iniciaba la respuesta inmune, pero algunos individuos producían anticuerpos dirigidos contra el péptido sintético pero que no reconocían los antígenos del parásito. En cambio, cuando este péptido se ciclizó, se encontró que todos los anticuerpos monoclonales obtenidos previamente contra el antígeno cíclico, reaccionaron contra el parásito.¹⁸

En general se ha logrado un notable avance. Los trabajos con mayor éxito hasta ahora, a nivel de campo, son sin duda los del grupo del doctor Patarroyo¹⁹, en Bolivia, con hasta un 77% de protección en niños. Este grupo ha estado usando un copolímero con epitopos de varios antígenos de la fase hemática del *P. falciparum*, llamado SPf66 (Cuadro II).

Aunque se ha avanzado con los diferentes tipos de vacunas, diseñadas para proteger contra la infección de parásitos, estas aún tendrán que mejorarse. El principal obstáculo para alcanzar una protección satisfactoria de la población humana y también del ganado doméstico en las zonas endémicas, es el grado de diversidad de los antígenos con relación a las clonas de los parásitos.^{20 y 21}

De los parásitos que tienen varias fases en su ciclo vital se han obtenido antígenos y sondas moleculares de varios de estos estadios. El caso más claro es el de los agentes causales de la malaria, principalmente *P. falciparum*. De *E. histolytica*, en cambio, sólo se tienen conocimientos sobre la biología celular y molecular de la fase de trofozoíto, no de los quistes, a pesar de ser ésta una parte importantísima de su ciclo vital. Esto se debe a que aún no se cuenta con un método adecuado para obtener quistes en condiciones axénicas.²² Consecuentemente sólo se dispone de antígenos y sondas moleculares de los trofozoítos. Nosotros diseñamos un medio de cultivo, llamado PEHPS,²³ con el cual desarrollamos métodos para la obtención de biomasa, en cantidades suficientes para realizar estudios con los trofozoítos²⁴ y donde las amibas se enquistan masivamente en condiciones axénicas, aunque por lo pronto con una pared defectuosa o inmadura.²² Teniendo este modelo de estudio posiblemente se encuentre la forma de interrumpir el ciclo biológico del

parásito, desarrollar nuevos métodos de diagnóstico y/o disponer de nuevas alternativas para el desarrollo de vacunas, tomando ahora como objeto de estudio al quiste.

Perspectivas

Desarrollo a mediano plazo de polinucleótido-terapia de enfermedades parasitarias. (*Matagens: Masking Tape for Gene Expression*). La traducción aproximada en español es: Cintas para enmascarar la expresión génica.

Desde que se tiene memoria, el hombre ha utilizado sustancias químicas, animales, vegetales o minerales para curar enfermedades infecciosas y parasitarias. En la era moderna se empezaron a usar sustancias químicamente puras con el mismo propósito. Pero en todos los casos es un principio bien aceptado, que un agente terapéutico será mejor cuanto más efectivo sea para el agente patógeno y menos tóxico para el hombre. Los farmacólogos modernos saben que esto se logra con drogas que ataquen con mayor eficiencia moléculas responsables de actividades vitales de los parásitos. Un ejemplo clásico es el de la penicilina, que bloquea la síntesis del peptidoglicano de la pared celular de las bacterias Gram positivas, y por lo tanto, es letal para ellas pero prácticamente inocua para el hombre, porque las células de éste no tienen pared.²⁵ Pues bien, a un grupo de biólogos moleculares se les ocurrió desarrollar unas drogas muy novedosas a base de oligonucleótidos.²⁶ Uno de los científicos más destacados en este campo es el doctor Paul Ts'o, de la Escuela de Salud Pública e Higiene de la Universidad John Hopkins. A ellos se les ocurrió la idea de identificar proteínas de importancia vital para virus, bacterias, protozoarios y células tumorales, de preferencia no conservadas, o con diferencias significativas con respecto a su contraparte en las células humanas, y hacer sintéticamente oligonucleótidos de unos 10 residuos con secuencia complementaria del RNA mensajero que codifica para la síntesis de las proteínas respectivas. Estas secuencias de RNA complementario son conocidas como Matagens, o Antisense (antimensajes), químicamente son oligonucleósidos metilfosfonatos, en los que un átomo de oxígeno de cada fosfato ha sido reemplazado por un grupo metilo, para facilitar su entrada a la

célula, su unión con el RNA o con el DNA y conferirle muy alta resistencia a las RNAsas. El resultado es el bloqueo altamente específico de la síntesis de proteínas blanco y la muerte selectiva del agente patógeno.²⁷ Esta es una interesante alternativa que ya está dando excelentes resultados para combatir tumores malignos, enfermedades producidas por virus y bacterias.²⁶

En el caso de las enfermedades parasitarias, quizás una de las perspectivas más promisorias es el desarrollo de la oligonucleótido-terapia. Aún no existe ningún oligonucleótido como droga antiparasitaria, pero identificando moléculas vitales para una especie determinada o una secuencia líder, que codifique para la síntesis de un grupo grande de proteínas, teóricamente es posible desarrollar potentes drogas antiparasitarias.*

Desarrollo de nuevas vacunas y métodos de diagnóstico.

En el terreno del diagnóstico molecular y el desarrollo de vacunas de nueva generación, las expectativas son a un plazo más corto, debido a que continuamente se están sintetizando sondas para el diagnóstico molecular de nuevas especies de parásitos y se trabaja intensamente en el diseño de nuevos antígenos copolímeros, se identifican antígenos naturales importantes para la inducción de inmunidad protectora de parásitos, se sigue experimentando con nuevas cepas de virus y bacterias recombinantes como vehículos de polivacunas y se trabaja intensamente en las técnicas para el diagnóstico de enfermedades parasitarias mediante la técnica de FISH.

Conclusiones

Gracias a todos los avances biotecnológicos, se dispone ya de técnicas muy confiables, rápidas y fáciles de aplicar y de interpretar para el diagnóstico de enfermedades parasitarias.

Se han desarrollado vacunas potentes y confiables contra parásitos, lo cual era prácticamente imposi-

* Doctor Paul Ts'o, comunicación personal)

ble hace apenas 20 años y se ha abierto el camino para disponer a mediano plazo de drogas antiparasitarias de baja toxicidad y alta potencia y especificidad.

Referencias

1. **Mathiopoulos K, Bouaré M, McConkey G, McCutchan T.** 4.3 PCR detection of *Plasmodium* species in blood and mosquitoes. En *Diagnostic of Molecular Microbiology. Principles and applications.* Persing DH, Smith TE, Tenover FC and White TJ (eds) American Society for Microbiology Washington DC. 1993. p. 462.
2. **World Health Organization.** Report of WHO Interregional Conference. Malaria control in countries where timelimited control is impractical at present. WHO Tech Rep Ser 1974;537:7.
3. Levine NDJ, Corliss FEG, Cox, G. et al. A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool* 1992;27:58.
4. **World Health Organization.** Epidemiology and control of African trypanosomiasis: report of WHO expert committee. WHO Tech. Rep. Ser. 1986; 739:1.
5. **Kirchhoff LV, Donelson JE.** 4.3. PCR detection of *Trypanosoma cruzi*, african trypanosomes and *Leishmania* species. En *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and applications.* Persing DH, Smith TE, Tenover FC and White TJ (eds) American Society for Microbiology Washington DC. 1993. p. 443.
6. **Clark CG.** 4.4. PCR detection of pathogenic *Entamoeba histolytica* and differentiation from other intestinal protozoa by ribotyping. En *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and applications.* Persing DH, Smith TE, Tenover FC and White TJ (eds) American Society for Microbiology Washington DC. 1993. p. 468.
7. **Ravdin JI, Shian DC, Kelsall BL.** Antigenicity, immunogenicity and vaccine efficacy of the galactose specific adherence protein of *Entamoeba histolytica*. *Vaccine* 1993;11:241.
8. **Persing DH.** 4.5 PCR detection of *Babesia microti*. En *Diagnostic of Molecular Microbiology. Principles and applications.* Persing DH, Smith TE, Tenover FC and White TJ (eds) American Society for Microbiology Washington DC. 1993. p. 475.
9. **Weiss JB.** 4.6 PCR detection of *Giardia lamblia*. En *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and applications.* Persing DH, Smith TE, Tenover FC and White TJ (eds) American Society for Microbiology Washington DC. 1993. p. 480.
10. **Mullis KB, Faloona FA.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335.
11. **Arévalo J, Inga R, López, M.** 4.2 PCR detection of *Leishmania braziliensis*. En *Diagnostic of Molecular Microbiology. Principles and applications.* Persing DH, Smith TE, Tenover FC and White TJ (eds) American Society for Microbiology Washington DC. 1993. p. 456.
12. **Britten RJ, Davidson EH.** Hybridization strategy. En B. D. Hames and Higgins S. J. *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach.* IRL Press, Oxford 1985. p. 3.
13. **Trask BJ.** Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Technical Focus* 1991;7:149.
14. **Nardin EH y Nussenzweig RS.** T cell responses against preerythrocyte stages. *Annu Rev Immunol* 1993;11:687.
15. **Stanley SL Jr, Jackson TFFG, Reed SL et al.** Sero diagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* protein. *JAMA* 1991;266:1984-16. Bloom BR. Vaccines for the third world. *Nature* 1989;342:115-17. Moss B, Flexner C. *Vaccinia Virus Expression.* *Rev Immun* 1987;5:305.
18. **Etlinger HM, Trzeciak A.** Towards a synthetic malaria vaccine: cyclization of a peptide eliminates the production of parasite unreactive antibody. *Phylos Trans Soc Lond Biol.* 1993;340:69.
19. **Mora AL, Patarroyo G, Rojas CL, Rojas M. et al.** Vaccination with SPF66, a chemically synthesised vaccine, against *Plasmodium falciparum* malaria in Colombia. *Lancet* 1993;341:705.
20. **Miller LH, Roberts T, Shahabuddin M, McCutchan TF.** Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP1). *Mol Biochem Parasitol* 1993;59:1.
21. **Dalrymple BP.** Molecular variation and diversity in candidate vaccine antigens from *Babesia*. *Acta Trop Basel.* 1993;54:227.
22. **Said Fernández S, Mata Cárdenas BD, González-Garza MT, et al.** *Entamoeba histolytica* cysts with a defective wall formed under axenic conditions. *Parasitol Res* 1993; 79:200.
23. **Said Fernández S, Vargas-Villarreal J, Mata Cárdenas B, et al.** PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Trans Trop Med Hyg* 1988;82:249.
24. **Said-Fernández S, Mata Cárdenas BD.** Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* in suspension. *Trans Trop Med Hyg.* 1992;86:173.
25. **Davies GL, Dibner MD, Battey JF.** *Basic Methods in Molecular Biology.* Elsevier. New York 1986; Section. 21. p226. Croke ST. Oligonucleotide therapy. *Curr Opin Biotech* 1992;3:650.
27. **Ts'o POP, Aurelian L, Chang E, Miller PS.** Nonionic oligonucleotides analogs (MatagenTM) as anticodic agents in duplex and triplex formation. *Ann NY Acad. Sci.* 1992; 660:159.
28. **Edman V, Meraz MA, Rausser S et al.** Characterization of an immunodominant variable surface antigen from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 1990;172:879.
29. **Ruiz-Palacios GM, Castañón G, Bojalil R Tercero et al.** Low risk of invasive amebiasis in cyst carriers. A longitudinal molecular seroepidemiological study. *Arch Med Res.* 1992;23:280.
30. **Myung K, Burch D, Jackson TFFG, Stanley SL Jr.** Serodiagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen based ELISA. *Arch Med Res* 1992;23:285.
31. **Lotter H, Mannweiler E, Tannich E.** Sensitive and specific serodiagnosis of invasive amebiasis by using a recombinant *Entamoeba histolytica* protein. *J Clin Microbiol* 1992;30:3163.

32. Millet P, Campbell GH, Sulzer AJ et al. Immunogenicity of Plasmodium falciparum asexual blood stage synthetic peptide vaccine SPF66. Am J Trop Med Hyg 1993;48:424.
33. Williamson KC, Criscio MD, Kaslow DC. Cloning and expression of the gene for Plasmodium falciparum transmission blocking target antigen Pfs230. Mol Biochem Parasitol 1993;58:355.
34. Cieslak PR, Zhang T, Stanley SL Jr. Expression of a recombinant *E. histolytica* antigen in a *Salmonella typhimurium* vaccine strain. Vaccine 1993;11:773.
35. Capron A. Un vaccine contre les bilharzioses. Strategies et perspectives. Rev Prat 1993;1543:457.
36. Samuelson J, Acuña-Soto R, Reed S et al. DNA hybridization probe for clinical diagnosis of *Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol 1989;27:871.
37. Acuña-Soto R, Samuelson J, De Girolami P et al. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* Am J Trop Med Hyg 1993;48:58.
38. Tannich E, Horstmann D, Knobloch J, Arnold HH. Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Proc Natl Acad Sci 1989;86:5118.
39. Tannich E, Burchard GD. Differentiation of the pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified *in vitro*.
40. Tachibana H, Ihara S, Kobayashi S et al. Differences in genomic DNA sequences between pathogenic and nonpathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* identified by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991;29:2234.
41. Tachibana H, Kobayashi S, Okuzawa E, Masuda G. Detection of pathogenic *Entamoeba histolytica* DNA in liver abscess fluid by polymerase chain reaction. Int J Parasitol 1992;22:1193.
42. Burch, DJ, Li E, Reed J et al. Isolation of a strain-specific *Entamoeba histolytica* cDNA clone. J Clin Microbiol 1991;49:297.
43. Garfinkel LI, Giladi M, Huber M et al. DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and nonpathogenic zymodemes. Infect Imm 1989;57:926.
44. Clark CG, Diamond LS. Ribosomal RNA genes of "pathogenic" and "nonpathogenic" *Entamoeba histolytica*. J Exptl Med 1991;49:297.

El desarrollo de la biotecnología biomédica en microbiología

Alejandro Cravioto,* Roberto Cabrera-Contreras**

Hasta hace poco tiempo los métodos de laboratorio para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas consistían en la observación al microscopio de los microorganismos aparentemente asociados con la enfermedad, el cultivo de éstos en medios especiales o bien la reproducción del daño causado por dichos agentes biológicos en células susceptibles o en animales de experimentación.^{1,7,8} Un avance en los métodos diagnósticos surge con la introducción de las técnicas de ingeniería genética en 1973, las cuales tienen las siguientes ventajas:

a) La sobreproducción de proteínas específicas mediante la clonación de genes que codifican para la síntesis de éstas y la introducción de estos genes a una célula receptora que replica la información.

b) El enriquecimiento de secuencias específicas de ácido desoxirribonucleico (DNA).

Los productos de estas técnicas tienen particular relevancia en la práctica médica actual; en especial, la producción de proteínas específicas las cuales pueden ser usadas como antígenos para inmunodiagnóstico y la introducción de sondas específicas de DNA las cuales permiten identificar agentes patógenos en especial de tipo viral.

Un nuevo impulso en los métodos de diagnóstico comienza a partir de 1975 con el desarrollo de técnicas para anticuerpos monoclonales y la introducción de métodos inmunológicos para la identificación de microorganismos patógenos; éstos últimos se basan en la detección de anticuerpos

* Académico numerario, Facultad de Medicina, UNAM

** Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM

específicos contra los mismos o contra proteínas producidas por estos germenés.^{1, 2, 7}

El empleo de esta metodología derivada de la biología molecular permitió en 1976 el establecimiento de la primera de muchas compañías para el desarrollo de biotecnología. En los quince años siguientes han aparecido multitud de estas empresas, principalmente en Japón y en los países del norte de América y Europa.^{1, 3, 5} Estas nuevas compañías de desarrollo de biotecnología han enfocado inicialmente sus intereses a la producción de proteínas con fines terapéuticos, y posteriormente, al desarrollo de pruebas de diagnóstico, así como a la elaboración de vacunas.

En el campo de las enfermedades infecciosas hay algunos microorganismos como el *Treponema pallidum* o el *Mycobacterium leprae* que no han podido cultivarse en medios artificiales; existen otros como los virus que requieren de pruebas inmunológicas indirectas o de cultivos muy prolongados para su identificación. Estas dificultades se han subsanado a través del uso de la biotecnología basada en el análisis y/o amplificación de los ácidos nucleicos de estos microorganismos, existiendo actualmente las siguientes técnicas de diagnóstico:^{1, 4, 5, 7, 8}

- 1) Sondas detectoras de DNA ó RNA
- 2) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 3) Extensiones de segmentos iniciadores "Primeros"
- 4) Amplificación de "señal" con replicasa Q-beta.
- 5) Análisis electroforético por inmunotransferencia.

Esta novedosa tecnología derivada de la biología molecular presagia la iniciación de una era en la que el desarrollo de técnicas basadas en el análisis de moléculas genéticas permitirá diagnósticos más tempranos y específicos, no sólo en el área de las enfermedades infecciosas, sino también en el cáncer, en la predisposición genética a ciertos padecimientos crónico-degenerativos y en la medicina forense.^{1, 4, 5}

Pruebas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

Las pruebas para diagnóstico de enfermedades infecciosas basadas en el análisis de ácidos nucleicos, son aquellas para las cuales no existen procedimientos de diagnóstico cuya sensibilidad y

especificidad aseguren un diagnóstico certero; entre ellas han cobrado interés pruebas para los siguientes padecimientos: hepatitis B, sida, infecciones por levaduras como *Candida albicans*,⁹ infecciones por estreptococo del grupo A, infecciones del aparato respiratorio bajo por *Mycoplasma pneumoniae*¹⁰ y *Legionella pneumophila*,¹¹ infecciones de transmisión sexual debidas a *Neisseria gonorrhoeae*¹² y *Chlamydia trachomatis*,¹³ infecciones del aparato urinario causadas por *Escherichia coli*, enfermedades por micobacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. gordonae*¹⁴ e infecciones por algunas de las bacterias patógenas que infectan el tracto gastrointestinal como *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* y *Campylobacter*.^{6, 15, 16}

El análisis de ácidos nucleicos se ha utilizado también para el diagnóstico de infecciones por bacterias patógenas obtenidas de muestras de placa dentobacteriana causantes de enfermedad periodontal. Existen, así mismo, sondas para detectar algunos factores de virulencia bacterianos tales como la toxina producida por *Vibrio cholerae* 01, las enterotoxinas, citotoxinas, factores de adherencia y de invasividad de *Escherichia coli*, plásmidos asociados con la virulencia en *Yersinia enterocolitica* y con la producción de hemolisina por *Listeria monocytogenes*.^{1, 6, 11} Se han desarrollado también sondas para detectar genes que codifican para la exotoxina y la pilina de *Pseudomonas aeruginosa*, la toxina B de *Corynebacterium diphtheriae* y la nucleasa de *Staphylococcus aureus*.^{17, 18, 19} En los casos de los factores de virulencia de *E. coli* asociada a procesos diarreicos, el desarrollo de sondas que detectan genes que codifican para sus enterotoxinas o sus factores de adherencia e invasividad, han permitido determinar la prevalencia e incidencia de diarrea causada por estos germenés a nivel de grandes grupos de población, al hacer comparables resultados obtenidos de estudios epidemiológicos realizados en diversas partes del mundo, en los cuales se ha utilizado esta misma tecnología de frontera.^{2, 4, 16}

A pesar de que el campo de acción de este tipo de pruebas de diagnóstico es bastante amplio, la lista de aquellas disponibles a nivel comercial es aún pequeña. Entre estas cabe mencionar la desarrollada para el diagnóstico del virus del papiloma humano (HPV). Esta técnica se basa en

la detección de secuencias características de RNA ribosomal, mediante un ensayo de transferencia de tipo "dot-blot" utilizando un marcador radiactivo. Se han desarrollado comercialmente también sondas para el diagnóstico de enfermedades asociadas con otros tipos de virus como adenovirus, citomegalovirus y virus *Herpes simplex*.^{1,3,5} Para el caso de las enfermedades parasitarias se cuenta en la actualidad con pruebas para discriminar diferentes tipos de *Leishmania* o de *Plasmodium* en sangre.^{1,7,8}

Las técnicas que utilizan sondas de DNA y RNA son teóricamente más sensibles y específicas que técnicas convencionales comúnmente utilizadas en laboratorios de diagnóstico, ya que detectan los elementos fundamentales de todos los "blancos" biológicos, es decir, secuencias específicas de genes.^{4,5,6} En la realidad, sin embargo, las técnicas de detección de ácidos nucleicos tienen mayor sensibilidad pero, en muchas ocasiones, menor especificidad que técnicas de diagnóstico más convencionales. Por otro lado, la detección de secuencias de ácidos nucleicos no es siempre sinónimo de la expresión fenotípica de estos genes. Una bacteria puede conservar genes que codifiquen para una determinada proteína, sin que esta se produzca o se exporte fuera de la célula. Este problema se hace más evidente con las técnicas de amplificación genética que se describen a continuación.

Entre las técnicas de amplificación genética destaca la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual consiste en separar cadenas dobles de DNA blanco (templados) a través de ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento, a las cuales se le unen en sus extremos segmentos específicos de DNA cortos llamados "primeros", los cuales actúan como sitios para otros ciclos de amplificación. La extensión del DNA está mediada por una enzima denominada polimerasa I del DNA. Este sistema permite un crecimiento geométrico del número de copias del "templado". La alta sensibilidad de esta técnica tiene el problema de reducir su especificidad. Esta técnica no tiene carácter cuantitativo ya que solamente determina la presencia de un blanco y no la cantidad del DNA específico que existe en la muestra analizada. La enzima más utilizada para este proceso es termol estable y se denomina *Taq* polimerasa, debido a que proviene de una bacteria termofílica conocida

como *Thermus aquaticus*. El proceso automatizado del PCR permite actualmente, por ejemplo, programar ciclos de cambios de temperatura con duración de 7 minutos cada uno, desarrollándose en una reacción típica de 70 ciclos cerca de dos millones de copias del DNA inicial en un tiempo total de 3.5 horas.^{3,4,7,8}

Existen otras técnicas de amplificación alternas al PCR; una de éstas emplea la enzima Q-beta replicasa. El procedimiento consiste en diseñar una RNA heterólogo derivado del bacteriófago MDV-1, el cual contiene como inserto una sonda específica entre 30 y 40 nucleótidos de longitud. La sonda recombinante se mezcla con la muestra que contiene la secuencia blanco, a la cual se pega específicamente la porción de la sonda del RNA recombinante. Después de eliminar el exceso de sonda a través de múltiples lavados, la sonda pegada se libera por calentamiento y se amplifica por el efecto de la enzima replicasa Q-beta. Esta enzima amplifica de manera geométrica el complejo detector del RNA del bacteriófago MDV-1, lo cual se detecta a través de sistemas colorímetros en el laboratorio. La reacción se efectúa de manera muy rápida, completándose cada ciclo en 15 a 30 segundos. Con este sistema se puede amplificar el complejo detector entre 100 y 1000 millones de veces, en una fase de reacción simple, a una temperatura determinada y a un tiempo corto de 30 minutos; el sistema es cuantitativo y detecta tanto DNA como RNA.^{5,7,8}

El obstáculo fundamental que presentan los ensayos diagnósticos ultrasensibles como los ya descritos, es la alta posibilidad de aparición de falsos positivos. Las fuentes potenciales de contaminación pueden estar dadas por las mismas moléculas de DNA o RNA producidas durante los procedimientos de amplificación, hasta por ácidos nucleicos presentes en las superficies del equipo o en los individuos que realizan los ensayos.^{5,6,8}

Recientemente, y con la finalidad de hacer productos diagnósticos más aceptables para los usuarios, se han tenido que realizar modificaciones a las técnicas ya descritas. Algunas de estas modificaciones son:

a) Desarrollo de marcadores enzimáticos, fluorescentes o quimioluminosos. En el caso particular del PCR y con objeto de evitar el uso de isótopos radiactivos, se ha introducido un análisis

final de tipo colorimétrico usando como sistema de detección una mezcla de biotina-avidina.

b) Otra innovación para mejorar la sensibilidad y reducir la "señal de ruido", consiste en unir moléculas de timidina [poly (dt)] a esferas magnéticas. Su empleo se realiza a través de la unión de segmentos complementarios de adenina [poly (da)] a "sondas de captura", las cuales contienen secuencias específicas para el ácido nucleico "blanco". Cuando estos pares de bases complementarios se unen entre sí, la esfera magnética con su complejo "sonda-blanco" se separa de la mezcla de manera tal que el DNA contaminante que produce una señal intensa de ruido se elimina con el lavado.

c) Se han desarrollado también técnicas de marcaje homogéneo para ensayos cuantitativos basados en la electroquimiluminiscencia o utilizando metales quelantes acoplados a sondas. El uso de estos procedimientos trata de resolver en parte el problema de la amplificación de la señal observada por PCR, eliminando el paso de separación que requiere electroforesis.

Mercado comercial

Se estima en la actualidad que el mercado comercial de productos para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas a nivel mundial es de 700 millones de dólares anuales. Para el año de 1992 se estimó que el mercado comercial para productos de diagnóstico basados en sondas de DNA, fue por encima de los 125 millones de dólares.^{1, 4, 20}

Perspectivas

Las ventajas de la aplicación de técnicas de biología molecular en microbiología no radica sólo en el diagnóstico rápido de las enfermedades que producen algunos gérmenes, particularmente los virus, sino que permite también un mejor manejo quimioterapéutico de algunas enfermedades, a través del desarrollo y uso de productos nuevos antivirales y de otros agentes biológicos como el interferón alfa.^{1, 6, 7, 20}

Como perspectiva, y posiblemente como uno de los aspectos más relevantes para el futuro de

la biotecnología, se puede mencionar el desarrollo de ensayos de diagnóstico múltiples. Mediante estas pruebas se pretende identificar de manera simultánea, la presencia de varios agentes patógenos; en la misma prueba sería posible obtener un perfil de los factores de resistencia a los antimicrobianos, con el fin de enfocar tratamientos quimioterapéuticos en una forma más racional. Este tipo de pruebas serán también de gran utilidad para el diagnóstico de enfermedades hereditarias, las cuales requieren de muchos estudios para determinar con precisión un defecto genético.^{3, 6, 7}

Comentarios

A pesar de lo limitado de los recursos, actualmente en México se cuenta con instituciones que desarrollan investigación científica en biotecnología de excelente y reconocida calidad. Desafortunadamente esta investigación es dispersa y se manifiesta con cierto carácter individual sin acciones grupales coordinadas. Urge, pues, que se estimulen en nuestro país acciones que permitan reforzar las relaciones científicas intra e interinstitucionales, así como la promoción de una mayor vinculación entre los centros de investigación y la industria privada, a fin de desarrollar pruebas de diagnóstico y otros productos biológicos basados en la tecnología del DNA recombinante o en el análisis de ácidos nucleicos; de esta manera será factible ayudar al control de padecimientos que afectan en forma importante la salud de nuestra población.

Referencias

1. **Cabrera CR.** Perspectivas de investigación biotecnológica básica. *Salud Pública Mex* 1989; 31:370-384
2. **Cravioto A, Trujillo F, Beltrán P, Hill WE.** DNA hybridization with oligodeoxynucleotide probes for identifying enterotoxin-producing *Escherichia coli*. *Mol Cell Probes* 1988; 2:125-130.
3. **Galindo FB.** Biotecnología: Oportunidades y Amenaza. Ciencia y Desarrollo, CONACYT 1988; 80:21-40.
4. **Persing DH.** Diagnostic Molecular Microbiology: Current challenges and future directions. *Diag Microbiol Infect Dis* 1993; 16: 159-163.
5. **Purgel VG, et al.** Genetic engineering of the livestock. *Science* 1990; 244:1291-1297.
6. **Siegler N.** DNA-based testing: A progress report. *ASM News* 1989; 55:308-312.

7. **Tussie I, Lizardi PM.** Amplificación de ácidos nucleicos. ICYT, CONACYT 1990; 12: 54-59.
8. **Watson JD, Hopkins NH, Robert JW, Argetsinger SJ, Winer AM.** Molecular Biology of the Gene, 4th. ed. Menlo Park: W.A. Benjamin, Inc., 1987: 240-281.
9. **Cheung LL, Hudson JB.** Development of DNA probes for *Candida albicans*. Diagn Microbiol Infect Dis 1988; 10: 171-179.
10. **Tilton RC, Dias F, Kidd H, Ryan RW.** DNA probe versus culture for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples. Diagn Microbiol Infect Dis 1988; 10: 109-112.
11. **Doebbling BN, Bale MJ, Koontz FP, Helms CM, Wenzel RP, Pfaller MA.** Prospective evaluation of the Gene-Probe assay for detection of *Legionellae* in respiratory specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1988; 7: 748-752.
12. **Granato PA, Franz MR.** Evaluation of a prototype DNA probe test for non-cultured diagnosis of gonorrhoea. J Clin Microbiol 1989; 27: 632-635.
13. **LeBarW, Herschman B, Jemal C, Pierzchala J.** Comparison of DNA probe, monoclonal antibody, enzyme immunoassay, and cell culture for the detection of *Chlamydia trachomatis*. J Clin Microbiol 1989; 27: 826-828.
14. **Gonzalez R, Hanna BA.** Evaluation of Gen-Probe DNA hybridization systems for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium intracellulare*. Diagn Microbiol Infect Dis 1987; 8: 69-72.
15. **Tompkins LS, Troup N, Labigne-Roussel A, Cohen ML.** Cloned random chromosomal sequences as probes to identify *Salmonella* species. J Infect Dis 1986; 154: 156-162.
16. **Stull TL, LiPuma JJ, Edlind TD.** A broad spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. J Infect Dis 1988; 157: 280-286-17.
17. **Coyle MB, Groman NB, Russell JQ, Harnisch JP, Rabin M, Holmes KK.** The molecular epidemiology of three biotypes of *Corynebacterium diphtheriae* in the Seattle outbreak, 1972-1982. J Infect Dis 1989; 159: 670-679.
18. **Liebl W, Rosenstein R, Gotz F, Schleifer KH.** Use of *Staphylococcal* nuclease gene as a probe for *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 1987; 44: 179-184.
19. **Samadpour M, Moseley SL, Lory S.** Biotinylated DNA probes for exotoxin A and pylin genes in the differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* strains. J Clin Microbiol 1988; 26: 2319-2323.
20. **Hacking JA.** Economics of Biotechnology. London: Cambridge University Press, 1986: 15-38, 39-73, 222-245.

El desarrollo de la biotecnología en la genética

Alessandra Carnevale*

En las últimas décadas, la genética humana ha logrado pleno reconocimiento como la disciplina que estudia la variabilidad humana y la herencia, y a la vez el enorme desarrollo de la biotecnología le está permitiendo profundizar en el conocimiento de muchas enfermedades que afectan al ser humano, y visualizar a corto plazo las estrategias novedosas para su tratamiento y prevención. En la actualidad, es posible localizar los genes en los cromosomas, aislar el ADN de un gen, clonarlo, identificar toda su secuencia de bases y conocer la estructura y la función de su producto proteico. Este nuevo enfoque de la genética humana está aportando conocimientos invaluablemente acerca de la función normal de los genes, los tipos de mutación que pueden sufrir, la consecuente anomalía del

producto génico, y por lo tanto, la fisiopatología de las enfermedades hereditarias.

Se abren nuevos caminos para el tratamiento y la prevención de las enfermedades hereditarias y ha nacido lo que se podría llamar la nueva genética que combina los conocimientos de la genética clásica con las técnicas de biología molecular.

Sería imposible en este breve espacio, analizar el extraordinario desarrollo que ha alcanzado la biotecnología en la genética humana y sus implicaciones en el diagnóstico, tratamiento y prevención de los trastornos hereditarios. Únicamente me referiré a algunos ejemplos de cómo el desarrollo de la biotecnología está aclarando o cambiando algunos conceptos clásicos de la genética humana.

* Jefe de la División de Investigación Médica. Instituto Nacional de Pediatría.

Impronta genómica

El principio de la equivalencia en las cruizas recíprocas, propuesto por Gregor Mendel, según el cual los genes se comportan en la misma forma sin importar de cuál progenitor provienen, ha sido un dogma de la genética durante más de un siglo. Recientemente se ha descubierto que algunos genes no obedecen a este principio, sino a un fenómeno denominado "impronta genómica", que se puede definir como el mecanismo por el cual la actividad de los genes homólogos en un individuo, difiere, dependiendo del sexo del progenitor que los transmite.¹ Se trata de un proceso que marca algunos genes específicos de manera diferente durante la gametogénesis del macho o de la hembra. Esta impronta genómica explica el por qué algunas mutaciones funcionan de diferente manera cuando se heredan del padre que cuando se heredan de la madre.²

El proceso que conduce a la impronta genómica es muy complejo, y comprende una interacción de diversos sucesos en genes y segmentos cromosómicos específicos, que incluyen metilación del ADN, compactación de la cromatina y replicación del ADN.³

A pesar de que la mayoría de los estudios sobre la impronta genómica se han realizado en mamíferos inferiores, diversos datos han sugerido que este mecanismo opera también en el humano, y en la actualidad se evalúa la expresión de genes específicos que causan enfermedad en el humano, con relación al sexo del progenitor que transmite el gen.²

En particular, el fenómeno de la impronta genómica se ha implicado en la etiología de dos síndromes raros: el síndrome de Prader-Willi (SPW) y el síndrome de Angelman (SA).⁴ El SPW se caracteriza por hipotonía neonatal, hiperfagia con obesidad grave, talla baja, hipogonadismo, manos y pies cortos y retraso mental leve a moderado. El SA es completamente diferente y se caracteriza por ataxia, convulsiones, hiperactividad, retraso mental profundo, con risa paroxística, microcefalia y algunas dismorfias.⁵

En ambos síndromes se habían observado alteraciones en la misma región q11-13 del cromosoma 15 y no se había podido aclarar la razón por la cual la misma alteración cromosómica produjera fenotipos tan diferentes. En la mayoría de los pacientes con

estos síndromes, se encuentran deleciones de dicha región cromosómica; sin embargo, mediante las técnicas moleculares, se ha demostrado que las deleciones son exclusivamente paternas en el SPW y exclusivamente maternas en el SA. En consecuencia, en los pacientes con SPW, la información genética presente es sólo materna y en el SA la información genética presente es sólo paterna. Los estudios moleculares más recientes han revelado que el o los genes del SPW están activos sólo en el cromosoma 15 heredado del padre y se encuentran metilados, y por lo tanto inactivos en el cromosoma 15 materno. Asimismo el gen o los genes del SA están activos en el cromosoma materno y metilados en el paterno.⁶ Esta metilación diferencial de la región 15q11-13 cuando el cromosoma es heredado por uno o el otro progenitor, es un claro ejemplo de impronta genómica en el ser humano y proporciona una explicación sobre el mecanismo genético involucrado en la etiología de estos dos síndromes. En la actualidad, los genes responsables de estos padecimientos, los mecanismos que inducen la metilación de los mismos y los procesos que los regulan, son objeto de investigaciones mediante las técnicas de la biotecnología.

Mutaciones dinámicas o amplificación de tripletas repetidas

Hace menos de 4 años, la caracterización de la mutación que produce el síndrome de X-frágil, reveló un nuevo elemento genético y un nuevo mecanismo de mutación.⁷ El elemento genético es una secuencia inestable de ADN producida por la amplificación de una tripleta, que en forma natural es repetida y polimórfica, p(CCG)_n. El mecanismo de la mutación, que se ha denominado mutación dinámica, implica el cambio en el número de copias de la tripleta que se relaciona con el número de copias presentes en un momento dado. Este proceso por el cual un cambio inicial en la secuencia del ADN produce inestabilidad y predispone a nuevos cambios en la secuencia de ADN, evidentemente contrasta con el concepto de las mutaciones clásicas o estáticas en las cuales el producto de una mutación tiene pocas probabilidades de sufrir nuevos cambios.⁸

El síndrome de X-frágil es la forma más común de retraso mental familiar y afecta aproximadamente 1 en 1250 varones.⁹ La enfermedad se asocia con la expresión de un sitio frágil sensible a folatos en la banda q27 del cromosoma X, por lo cual el análisis cromosómico permitió, durante años, diagnosticar a los pacientes e identificar a las mujeres portadoras de la mutación con relativa precisión. La forma de herencia de este padecimiento había mostrado ciertas particularidades como: la no penetrancia en algunos sujetos masculinos, quienes a pesar de transmitir la mutación a sus hijas, no tenían retraso mental ni el fenómeno de anticipación en las generaciones sucesivas.¹⁰

La inestabilidad progresiva en el número de las repeticiones de la tripleta CCG durante la transmisión de una generación a otra y que culmina en la falla en la expresión del gen, explica dichas peculiaridades en el síndrome de X-frágil. Como consecuencia de esta inestabilidad, los miembros de una misma familia pueden tener números diferentes de tripletas.

El cromosoma X normal contiene entre 6 y 50 repeticiones de la tripleta. La mutación aparece como un pequeño incremento en el número de tripletas entre 50 y 200 (premutación), y no se asocia con un fenotipo anormal, pero predispone a las mujeres portadoras a procrear hijos afectados. La mutación completa se caracteriza por un incremento considerable en el número de repeticiones entre 200 y 3000, y se acompaña de las manifestaciones clínicas del síndrome. Por otra parte, se ha demostrado que el número de repeticiones aumenta cuando se transmite por la mujer y se modifica muy poco cuando se transmite por el varón.¹¹

En la actualidad, se conocen por lo menos otras cuatro enfermedades genéticas debidas a la amplificación de tripletas repetidas (Cuadro I), y las propiedades de este nuevo tipo de mutación ha permitido explicar la penetrancia incompleta, la expresión variable y la anticipación que se habían observado en estos padecimientos hereditarios. En particular, la anticipación se refiere a que en las generaciones sucesivas, la edad de inicio de la enfermedad es más temprana y el cuadro clínico más grave. El fenómeno de la anticipación se había observado en diversas enfermedades here-

ditarias; sin embargo, se pensaba que era un artefacto debido a un sesgo en los estudios familiares. Ahora, el hallazgo de estas mutaciones dinámicas ha permitido reconocer un mecanismo genético que explica el fenómeno de la anticipación tanto en la distrofia miotónica como en la enfermedad de Huntington y en el síndrome de X-frágil.¹² Además, en estas tres enfermedades, el sexo del progenitor se relaciona con el incremento en el número de repeticiones de la tripleta involucrada en el padecimiento y la transmisión de las formas más graves. En el caso de la distrofia miotónica, la aparición de la forma congénita se observa cuando la transmisión es por medio de las mujeres, y en la enfermedad de Huntington la transmisión paterna produce la aparición de las manifestaciones clínicas a una edad significativamente más temprana.⁸

Cuadro I. Enfermedades debidas a la amplificación de tripletas repetidas

Enfermedad	Herencia	Transmisión tipo grave	Tripleta repetida	Nº normal	Nº en enfermos
X-frágil	D. lig-X	materna anticipación(mutación y penetrancia)completa) reducida	CCG	10-50	52-200 (premutación) 200-3000 (completa)
Atrofia muscular espinobulbar	R. lig-X	? Gravedad variable	AGC	11-31	40-62
Distrofia miotónica	A.D.	materna anticipación	AGC	5-35	50-80
Enfermedad de Huntington	A.D.	paterna inicio temprano	AGC	9-34	50-100
Ataxia espino cerebelosa Tipo 1	A.D.	anticipación	paterna	AGC	25-36 (posible)
FRAXE retraso mental leve	Lig-X	? anticipación	CCG	6-25	25-200 (premutación) > 200 (completa)

D. lig-X = Dominante ligada al X
 R. Lig-X = Recessivo ligada al X
 A.D. = Autosómica dominante

Heterogeneidad genética

El concepto clásico de heterogeneidad genética se refiere a la situación en la cual dos o más genes diferentes, producen fenotipos similares y la expresividad variable a la situación en la cual un mismo genotipo varía en su expresión fenotípica. Así, por ejemplo, en la osteogénesis imperfecta que se caracteriza por fragilidad ósea, baja talla, escleróticas azules, dentinogénesis imperfecta e hipoacusia, se había reconocido heterogeneidad clínica y genética por la variabilidad en la gravedad del cuadro clínico, y porque algunas formas eran dominantes y otras recesivas. Los estudios moleculares en ésta y en otras enfermedades hereditarias, han permitido no solamente reconocer que hay heterogeneidad genética en el sentido de que existen mutaciones en diversos genes capaces de producir fenotipos similares, sino que además, puede haber heterogeneidad alélica.¹³ La heterogeneidad alélica implica que diferentes mutaciones en el mismo *locus* (gen) pueden ser responsables de la variabilidad clínica que se observa en la misma enfermedad. Como ejemplo se puede mencionar la fibrosis quística, que es la enfermedad autosómica recesiva más frecuente en la población caucásica. En 1989, mediante estudios moleculares, se localizó y se caracterizó el gen que causa esta enfermedad en el cromosoma 7.¹⁴ Al conocer la secuencia del gen se pudo identificar la estructura de la proteína codificada por el gen y se le denominó proteína reguladora de la conductancia transmembranal (CFRT). Los estudios más recientes han demostrado que la proteína CFRT se encuentra en la membrana de las células, y tiene función de canal de cloro. Su ausencia o su estructura anormal altera el transporte del cloro a través de las membranas epiteliales. Este defecto es la causa de los trastornos pulmonares, pancreáticos, intestinales y cutáneos de los pacientes con fibrosis quística.¹⁵ El estudio de miles de pacientes con fibrosis quística en diferentes países ha permitido reconocer más de 200 diferentes mutaciones en el gen, cuya frecuencia varía según las poblaciones.¹⁶ La correlación genotipo-fenotipo en los pacientes con diferentes mutaciones, ha demostrado que algunas producen un fenotipo más grave que otras.^{17, 18} En la actualidad se reconoce que en este padecimiento al igual que en otros, la heterogeneidad alélica explica la variabilidad en las manifestaciones

clínicas, ya que los pacientes pueden ser homocigotos para una misma mutación o heterocigotos compuestos y presentar diferentes mutaciones en ambos alelos.

Disomía uniparental

Con base en los estudios citogenéticos de abortos espontáneos que mostraban una elevada frecuencia de aneuploidías, en 1980 Engel propuso un nuevo concepto, el de la disomía uniparental para explicar algunas anomalías congénitas.¹⁹ La propuesta se refiere a que el cigoto diploide, cromosómicamente normal, en ocasiones puede ser el producto de la fusión de dos gametos anormales, uno con los dos miembros de un par cromosómico y el otro con cero miembros. Esta situación hipotética produce un cigoto y en consecuencia un individuo, en el cual ambos miembros de un par de cromosomas homólogos provienen del mismo progenitor. Este mecanismo favorece la homocigocidad para genes recesivos responsables de una enfermedad autosómica recesiva.

La biotecnología y los estudios moleculares en pacientes con enfermedades genéticas, han demostrado que, en efecto, este mecanismo ocurre en el humano y puede ser el responsable de las enfermedades recesivas y de otras anomalías genéticas. La primera evidencia la proporcionó el estudio de un paciente con fibrosis quística y talla baja, en el que los estudios moleculares mostraban que había heredado dos copias idénticas de marcadores genéticos maternos para el cromosoma 7.²⁰

Más tarde, se describió un paciente con deficiencia completa del cuarto componente del complemento humano (C4) y disomía uniparental para el cromosoma 6 paterno.²¹ En la actualidad, esta anomalía en la segregación cromosómica se ha demostrado también en algunos pacientes con los síndromes de Prader-Willi y Angelman y en algunos casos de rearreglos cromosómicos.^{22, 23}

Los posibles mecanismos de producción son: a) la fertilización de un gameto nulisómico para un cromosoma por un gameto disómico para el mismo par cromosómico; b) la pérdida de un cromosoma supernumerario en una célula con aneuploidía; c) la pérdida de un cromosoma seguida por la duplicación

del cromosoma homólogo en una célula somática.

Una vez más, la biotecnología revela los nuevos mecanismos que explican los cambios genéticos responsables de trastornos en el ser humano.

Mosaicismo somático

Se entiende por mosaicismo somático, la presencia en el mismo sujeto de líneas celulares con constitución genética diferente, y por lo general, se debe a un suceso mutacional postcigótico. De hecho, los mosaicismos se han reconocido desde hace años en síndromes cromosómicos como la trisomía 21, la monosomía X o síndrome de Turner y el síndrome de Klinefelter entre otros.²⁴ Además, el análisis cromosómico de las células de diferentes zonas del organismo, indica que algunos datos clínicos como los cambios de la pigmentación en forma de manchas, o bien los crecimientos anormales de algunas zonas corporales pueden deberse a mosaicismo cromosómico somático.²⁵

En el pasado, sólo se podían reconocer los mosaicismos cromosómicos, pero con el advenimiento de las técnicas de biología molecular, se pueden ahora identificar los mosaicismos producidos por mutaciones génicas y conocer mejor el papel que juegan en la patología humana. Así, se ha propuesto que, en algunas ocasiones, las manifestaciones leves en un individuo con una enfermedad genética por mutación *de novo*, se deban a un mosaicismo somático de la mutación génica. Esto significa que no todas las células del sujeto presentan la mutación, y por lo tanto, el cuadro clínico es menos grave que el habitual en esa enfermedad. Para poder corroborar el mosaicismo, es necesario identificar la mutación génica por medio de las técnicas de biología molecular y demostrar en el individuo la presencia de las dos poblaciones celulares, una con la mutación y la otra normal.¹³

Por otra parte, si la mutación ocurre en las células germinales de una persona fenotípicamente normal, es posible que un padecimiento conocido como dominante, recurra en más de un hermano a pesar de que ambos padres sean normales.

En conclusión, el fenómeno del mosaicismo somático seguramente afecta a todos los organismos multicelulares, aunque se desconoce su frecuencia.

Cuando se expresa en las células somáticas, puede ser causa de neoplasias, de los procesos del envejecimiento y de las variaciones en la expresión fenotípica de diversos padecimientos genéticos. Cuando ocurre en las líneas germinales, puede producir agregación familiar y explicar la recurrencia familiar de mutaciones raras.

Es así como la nueva genética, con los recursos que aporta la biotecnología, ofrece la posibilidad de comprender la patología molecular de un gran número de enfermedades genéticas que afectan al humano, las herramientas para descubrir nuevos mecanismos genéticos que las producen y aclarar fenómenos que durante muchos años han sido inexplicables para los genetistas.

Estamos asomándonos a una de las más excitantes etapas de la biología y de la medicina.

Referencias

1. **Sapienza C.** Parental imprinting of genes. *Scientific American* 1990; 263:26-32.
2. **Hall JG.** Genomic imprinting. Review and relevance to human diseases. *Am J Hum Genet* 1990; 46:857-73.
3. **Surani MA.** Silence of the genes. *Nature* 1993;366:302-303.
4. **Nicholls RD.** New insights reveal complex mechanisms involved in genomic imprinting. *Am J Hum Genet* 1994;54:733-740.
5. **Jones, KL.** Smith's recognizable patterns of human malformations. 4th Ed. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 1988.
6. **Reis A, Dittlich B, Greger V y cols.** Imprinting mutations suggested by abnormal methylation patterns in familial Angelman and Prader-Willi Syndromes. *Am J Hum Genet* 1994;54:741-747.
7. **Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS y cols.** Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991;65:905-914.
8. **Sutherland GR, Richards RJ.** Dynamic mutations on the move. *J Med Genet* 1993;30:978-981.
9. **Oostra BA, Jacky PB, Brown WT, Rousseau F.** Guidelines for the diagnosis of fragile-X syndrome. *J Med Genet* 1993;30:410-413.
10. **Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, y cols.** Further segregation analysis of the fragile-X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet* 1985;69:289-299.
11. **Reiss AL, Kazazian HH Jr, Krebs CM, McAughan A, Boehm CD, Abrams MT, Nelson DL.** Frequency and stability of the fragile X premutation. *Human Molecular Genetics* 1994;3:393-398.

12. **Wieringa B.** Commentary: myotonic dystrophy reviewed: back to the future? *Human Molecular Genetics* 1994;3:1-7.
13. **Thompson MW, McInnes RR, Willard HF.** Genetics in medicine 5a Ed. Filadelfia, W.B. Saunders Company, 1991.
14. **Kerem BS, Rommens J, Buchanan J, Markiewicz D, Cox T, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui L.C.** Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989;245:1074-1080
15. **Brock DJH, Shrimpton AE, Jones C, McIntosh I.** Cystic fibrosis: the new genetics. *J R Soc Med* 1991; suppl.18,84:2-6.
16. **Orozco L, Salcedo M, Lezana JL, Chávez M, Valdez H, Moreno M, Carnevale A.** Frequency of delta-F508 in a mexican sample of cystic fibrosis patients. *J Med Genet* 1993;30:501-502.
17. **Curtis A, Nelson R, Porteous M, Burn J, Bhattacharya SS.** Association of less common cystic fibrosis mutations with a mild phenotype. *J Med Genet* 1991;28:34-37.
18. **Orozco L, Lezana JL, Villarreal MT, Chávez M, Carnevale A.** Mild cystic fibrosis disease in three Mexican delta-F508/G551S compound heterozygous siblings. *Clin Genet*, en prensa 1994.
19. **Engel E.** A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. *Am J Med Genet* 1980;6:137-143.
20. **Spence JE, Perciaccante RC, Greig GM y cols.** Uniparental disomy as a mechanism for human genetic disease. *Am J Hum Genet* 1988;42:217-226.
21. **Welch TR, Belschel LS, Choi E, Balakrishnan, Bioshof NA.** Uniparental isodisomy 6 associated with deficiency of the fourth component of complement. *J Clin Invest* 1990;86:675-678.
22. **Robinson WP, Wagstaff J, Bernasconi Fycols.** Uniparental disomy explains the occurrence of the Angelman or Prader-Willi syndrome in patients with an additional samil inv dup(15) chromosome. *J Med Genet* 1993;30:756-760.
23. **Petersen MB, Bartsch O, Adelsberger PA, Mikkelsen M, Schwinger E, Antonarakis SE.** Uniparental isodisomy due to duplication of chromosome 21 occurring in somatic cells monosomic for chromosome 21. *Genom cs* 1992 13:269-274
24. **Emery, AEH, Rimoin D.L.** Principle and practice of medical genetics. 2a Ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1991.
25. **Hall, JG.** Review and hypotheses: Somatic mosaicism observations related to clinical genetics. *Am J Hum Genet* 43:355-363. 1988.

El impacto de la biotecnología en inmunología

Alberto Palacios-Boix*

"No es fácil transmitir -a menos que uno lo haya vivido-, ese sentimiento de iluminación súbita que inunda la mente cuando la idea correcta cae por fin en su lugar"

Francis Crick (1916 -)

En un proceso acelerado que despuntó con el principio de inmunización descubierto por Jenner, la inmunología se ha visto permeada y renovada continuamente por los avances tecnológicos. No es gratuito decir que es una especialidad que ha crecido y se ha diversificado a la par con el desarrollo biotecnológico de este siglo. Los inmunólogos empleamos una variedad de técnicas que parten del análisis bioquímico, la fragmentación protéica, la estimulación celular, la verificación de reacciones entre compuestos glucoprotéicos y su afinidad, hasta el empleo de técnicas genéticas para identificar y secuenciar mo-

léculas operativas en procesos inmunes. Pocas especialidades médicas emplean tal arsenal de recursos técnicos para dar respuesta a las interrogantes clínico-patológicas que enfrentan.

Típicamente, la inmunología ha desarrollado sus propios escenarios técnicos, a partir del reconocimiento de las interacciones de especificidad antígeno-anticuerpo. Los experimentos seminales de Landsteiner y Ehrlich, que permitieron la identificación de sustancias serológicas, que transferidas de un individuo a otro, conferirían protección, obligaron desde los albores del siglo XX a diseñar los recursos para aislarlas y purificarlas.

* Investigador y médico titular. Departamento de Inmunología y Reumatología. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

A partir de la observación seminal de que las moléculas de anticuerpo son considerablemente mayores que los antígenos, y por lo tanto no difunden en membranas semipermeables (Figura 1), se fijaron las bases experimentales para el diagnóstico inmunológico. Los primeros métodos utilizaban mallas de gelatina o polímeros aplicados a superficies lisas de vidrio, que podían ser teñidos para identificar bandas o curvas de contacto protéico, y que traducían la existencia de una reacción antígeno-anticuerpo (lo que se conoce aún hoy como inmunodifusión simple o técnica de Ouchterlony). Con el descubrimiento aportado por la química orgánica de que las proteínas migran al aplicárseles una carga eléctrica, se mejoraron los procedimientos de detección *in vitro* de reacciones las antígeno-anticuerpo. Gradualmente, se recurrió a técnicas cuantitativas para correlacionar la magnitud de estas reacciones con estados clínicos definidos. La ciencia salía de la probeta para acomodarse en el lecho del enfermo.

Se logró la identificación de las proteínas circulantes y su determinación relativa en suero con la ayuda innovadora de la electroforesis (Figura 2). La fracción gamma fue separada para reconocer los componentes involucrados en la reacción antigénica. Paralela-

mente, se desarrollaban polímeros y haptenos simples, con el fin de establecer los requerimientos mínimos de las reacciones de anticuerpos. Se emplearon enzimas para aislar sus componentes activos y sus fracciones cristalizables. Así mismo se aprovechó la cristalografía naciente y las técnicas de precipitación para purificarlos en mayores cantidades y mostrar hasta qué punto la elasticidad de la estructura terciaria de las proteínas contribuía a la afinidad y a la avidez de los anticuerpos por sus respectivos antígenos. Nacían así los conceptos de especificidad y variabilidad. Con ellos, la ingente necesidad de secuenciar los anticuerpos para determinar en qué sitios radica esta flexibilidad del sistema inmune.

Hacia finales del siglo XIX, el zólogo ruso Ilya Metchnikoff, encontró que las células tales como amibas y leucocitos comparten una función peculiar, que consiste en rodear partículas y engullirlas, un proceso que denominó fagocitosis. Metchnikoff anticipó que este mecanismo contribuye cardinalmente al control de las infecciones mediadas por el sistema inmune celular. De esta observación derivaron numerosos estudios para demostrar la participación de polimorfonucleares y macrófagos en fenómenos de reconocimiento y erradicación de bacterias y parási-

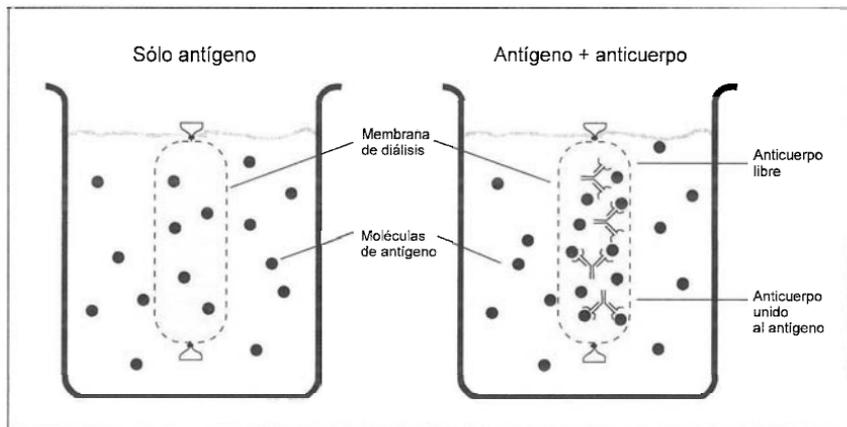


Figura 1. Reacción antígeno anticuerpo por diálisis de equilibrio. En ausencia de anticuerpo, el antígeno se difunde uniformemente en la solución. Al introducir el suero (o el antisuero) en la bolsa de diálisis, se establece un equilibrio que da cuenta de la afinidad de la reacción. Esta técnica elemental aún en uso, se ha refinado con recursos biotecnológicos.

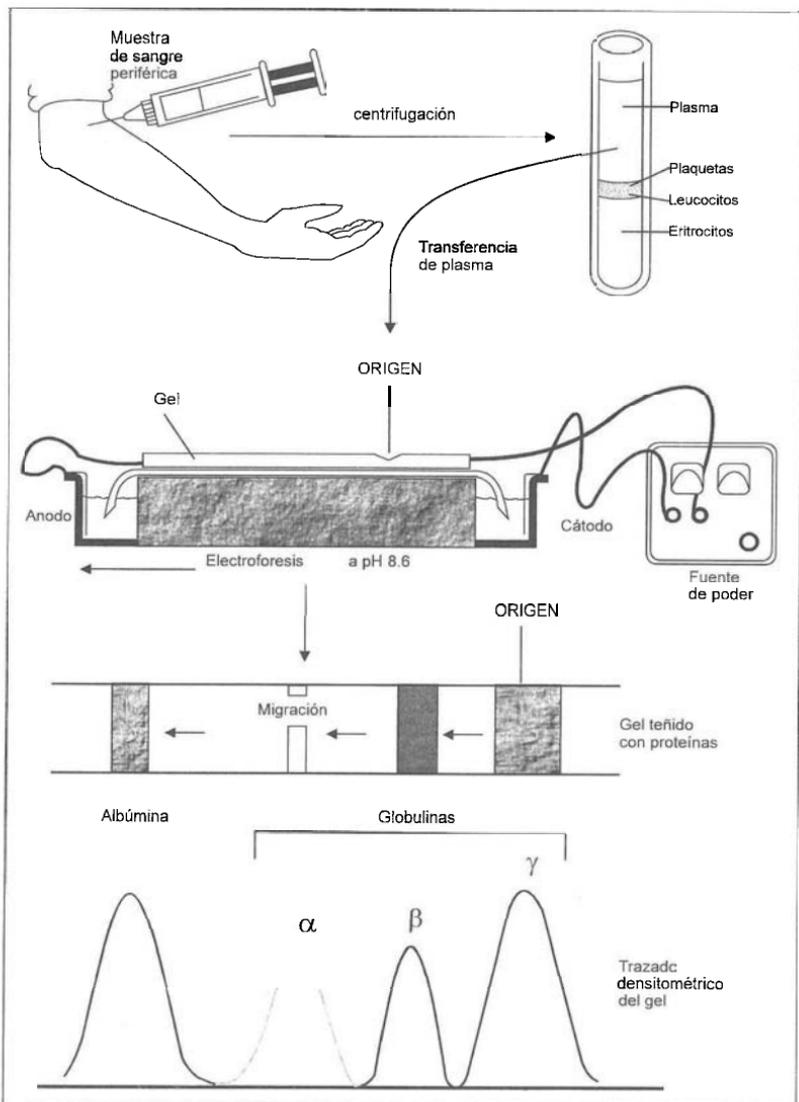


Figura 2. Electroforesis de proteínas. Este procedimiento electroquímico permite aislar las inmunoglobulinas del plasma y analizar su naturaleza (mono o policlonal).

tos. Se indagaron así los mecanismos de quimiotaxis y quimiocinesis, y se implementaron técnicas de laboratorio para analizar la movilidad y afinidad de los leucocitos por sus blancos antigénicos.

Sin embargo, el descubrimiento de las toxinas diftérica y tetánica por Kitasato y von Behring en 1890, relegó a la teoría fagocítica del primer plano entre los mecanismos de defensa inmune. El desarrollo de recursos para identificar la naturaleza de la respuesta celular, tendría que esperar otras cuatro décadas para recobrar su ímpetu. No obstante este desfase, la disciplina de la inmunología consolidó su lugar entre las ciencias médicas con la fundación de las revistas *Zeitschrift für Immunitätforschung* (1908) y *American Journal of Immunology* (1916), que se sumaron a la reconocida publicación del Instituto Pasteur.

La primera mitad de nuestro siglo se dedicó en buena medida a desentrañar las propiedades de diversos antígenos para serodiagnóstico, a perfeccionar los mecanismos de transferencia pasiva y de inmunización activa, y a dirimir la naturaleza de las reacciones anafilácticas con base en el conocimiento de la hipersensibilidad inmediata y tardía. En Dinamarca, Arrhenius acuñó el término "inmunoquímica" en 1904, para reflejar la confraternidad que se había forjado entre estos dos campos científicos, impulsados a converger por el empleo creciente de empleo de técnicas electroquímicas en la investigación.

Una contribución determinante surgió de los trabajos de F. Obermeyer y E. P. Pick, quienes en 1906 mostraron que los antígenos protéicos modificados químicamente alteran su especificidad inmunológica. Pick refinó la observación a través de incontables experimentos de inmunoquímica, hasta designar a las estructuras modificadas como haptenos. Estos grupos sintéticos mínimos, simplificados, sirvieron paradójicamente para asentar todo el edificio conceptual de la inmunología en la primera mitad del siglo. A ellos, sus acarreadores y los recursos para demostrar su actividad, debemos las reacciones de inmunoprecipitación, las sustancias adyuvantes, la búsqueda de especies inmunotolerantes, el aislamiento y la fragmentación bioquímica en inmunodiagnóstico, y, al menos en parte, la serotificación que abrió paso a la investigación genuinamente científica en el campo de los trasplantes.

Al finalizar la Segunda Guerra Mundial, la disponibilidad de recursos bélicos se transfirió al desarrollo científico. Una renovada motivación permeaba a las sociedades industriales, y se destinaron recursos sin precedentes para el desarrollo de laboratorios equipados con precoces analizadores, microscopios de contraste de fases y de fluorescencia, incubadoras, etc. El escenario estaba planteado para una revolución conceptual y tecnológica en inmunobiología.

Los que tomaron la antorcha de relevo fueron Peter Medawar y Macfarlane Burnet como sus contribuciones legendarias en trasplantes de tejidos y la teoría celular de la respuesta inmune. Esto trajo consigo una avalancha de ideas sobre el origen de los anticuerpos, la anatomía y fisiología del sistema inmune, las reacciones de citotoxicidad, los mecanismos de rechazo de injerto y, con la estrategia lanzada al futuro, la manera de controlar la intensidad de las respuestas efectoras para inmunoterapia. Fue por tanto imperativo renovar los microscopios, diseñar aparatos de electrodiagnóstico más sofisticados y pensar ya en técnicas de aislamiento celular para investigación y tratamiento.

A partir de estos avances, se pudo establecer que las células del sistema inmune se concentran en órganos (que denominamos linfoides), óptimos para el crecimiento y diferenciación inducidos por antígenos. Los linfocitos migran y se intercambian entre la circulación y los tejidos, así como los sitios donde se asientan los antígenos para que se den las respuestas efectoras. Esta interacción bidireccional permite que los mecanismos de defensa se multipliquen y se procure la especificidad y la memoria, como características biológicas selectivas de la respuesta inmune. El refinamiento alcanzado permitió cuantificar y discriminar las células responsables de tales fenómenos y diseñar cultivos para mantenerlas en crecimiento, analizar sus interacciones e inmortalizarlas. Quedaba por definir qué moléculas de superficie son responsables de esta comunicación celular.

Entretanto, la inmunoquímica se perfeccionaba. El empleo de corrientes eléctricas para agilitar la reactividad antígeno-anticuerpo derivó en un recurso más específico denominado inmunolectroforesis y que se elaboró más adelante hasta conseguir procedimientos más avanzados que

incluyen la reactividad mediante detección enzimática (ELISA), el radioinmunoanálisis o la inmunoelectrotransferencia (una estrategia cada vez más usada por su especificidad, que en el caso de proteínas condujo a la técnica llamada *Western blot* (Figura 3). Los procesos mencionados superan con mucho a las técnicas cualitativas usadas rutinariamente en laboratorios clínicos (pruebas de látex o hemaglutinación). Estas técnicas permiten identificar cantidades que oscilan entre 20mg/mL y 2 mg/mL del anticuerpo de interés.

A medida que se aumenta la sensibilidad, empleando por ejemplo partículas marcadas, se pueden identificar cantidades de anticuerpo cercanas a 1 mg/mL.

La necesidad de emplear métodos más estables y objetivos en la detección de reacciones inmunes, dió paso al empleo de técnicas tales como la inmunofluorescencia y ensayos enzimáticos. Algunas de estas técnicas requieren de tiempo y destreza, pero han sido simplificadas con la mercantilización de equipos y estuches cada vez más específicos. Más aún, la difusión de la inmunofluorescencia trajo consigo una de las contribuciones más importantes en la modernización biotecnológica de la inmunología: el citofluorógrafo, que se comenta más abajo. Entretanto, las técnicas de cultivos de linfocitos se nutrieron de la detección de tumores productores de anticuerpos y el asilamiento de mielomas, virtualmente aplicando la inmortalización celular al estudio de las interacciones antígeno-anticuerpo. Se intentó repetidamente aislar anticuerpos homogéneos o derivados de una sola célula para analizar su especificidad. En 1975, Köhler y Milstein desarrollaron la técnica de fusión somática tomando una célula de mieloma y un linfocito B modificando su capacidad replicativa. Con esta técnica, se logró un salto cualitativo en la síntesis de anticuerpos monoclonales y su eventual utilización en estrategias de reconocimiento molecular. Se adelantó la inmunoidentificación fenotípica de marcadores celulares, el reconocimiento de antígenos tumorales y el análisis funcional de las estructuras de la superficie celular y sus capacidades de transmisión de mensajes citoplasmáticos y nucleares.

El descubrimiento del mecanismo de acción genética proveyó un gran incentivo para el desarrollo de métodos de aislamiento de genes y sus

productos. Se buscaba al mismo tiempo determinar su estructura y entender cómo están regulados. Los avances tempranos surgieron del conocimiento de que algunas bacterias producen enzimas que cortan el DNA en sitios específicos. La purificación de estas enzimas de restricción, apareado con la demostración de que la estructura helicoidal del DNA se desnaturaliza bajo tratamiento con calor o alcalinizantes, permitió la concepción de las técnicas de hibridación, tan empleadas en la actualidad. La era del DNA recombinante se inició hacia 1970, cuando se demostró que se podían insertar secuencias cortas de DNA animal o humano en estructuras definidas conocidas como plásmidos, que utilizan las bacterias para su replicación y para transmitir información genética.

Este extraordinario avance biotecnológico ayudó a estudiar no sólo productos bacterianos sino numerosas proteínas celulares que no habrían podido aislarse de otro modo. Hoy día es posible transferir genes a células en cultivo o aún en huevos fertilizados para inducirlos a generar sus productos moleculares en ambientes distintos y estudiar sus funciones en forma aislada.

La inmunología aprovechó estos adelantos desde su nacimiento y en 1983, se pudo establecer la naturaleza molecular del receptor de linfocitos T y con ello abrir toda una era en la secuenciación de estructuras de superficie encargadas de reacciones inmunes: correceptores, integrinas, moléculas de adhesión, activadores y transductores de señales, etc. La versatilidad de estas moléculas se ha hecho evidente con la instrumentación del citofluorógrafo, instrumento que combina los avances de la cristalografía, la computación y la fluorescencia con la aplicación de rayos láser. Actualmente, el citofluorógrafo es un aparato de uso obligado en numerosos laboratorios, capaz de aislar e identificar célula por célula una vez que su superficie ha sido teñida con anticuerpos monoclonales (Figura 4). El procedimiento implica que cada célula que pasa a través de un filtro lineal computarizado, es enfocada por un rayo láser que la reconoce, y de ser necesario, la desvía a un compartimento para su separación (una adaptación más contemporánea llamada "*cell-sorter*"). El citofluorógrafo ha revolucionado la identificación y manipulación de células linfoides y hematopoyéticas; ha incrementado logarítmicamente nuestra

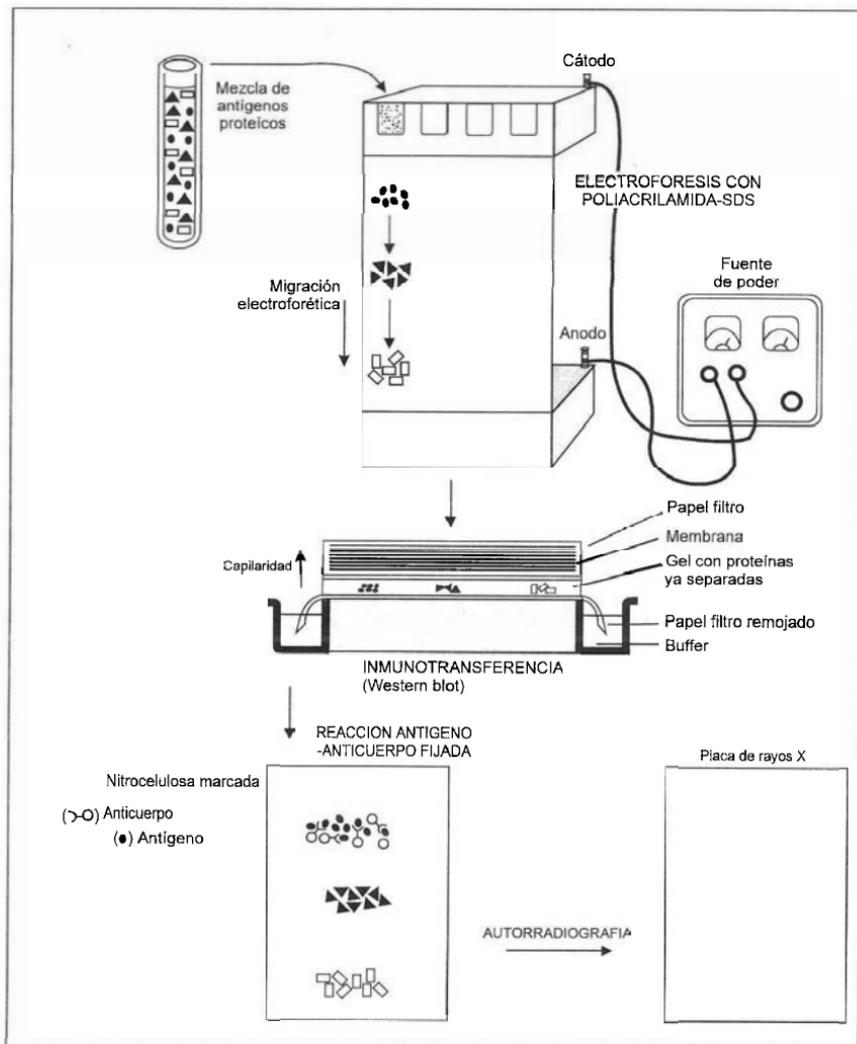


Figura 3. Inmuno-electrotransferencia. Mediante una elaborada instrumentación, se pueden recoger las interacciones antígeno-anticuerpo en proporciones y pesos moleculares conocidos. La técnica también ha sido empleada para purificar antígenos específicos.

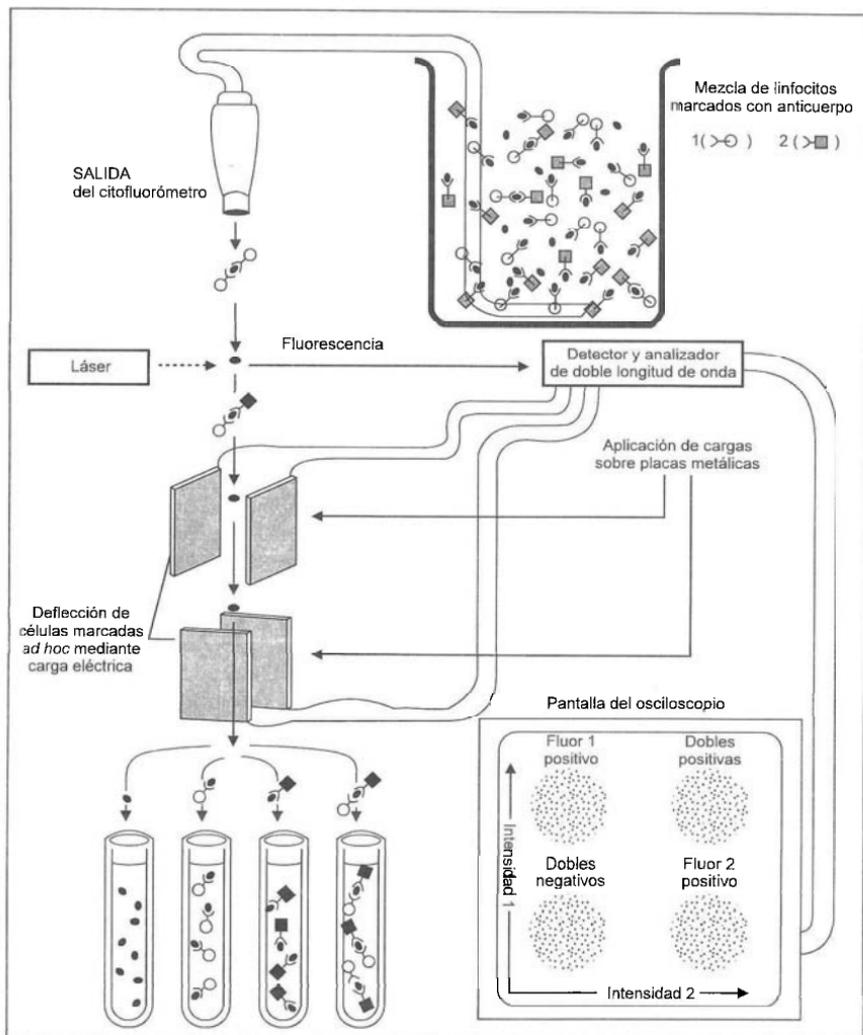


Figura 4. Separación y análisis celular por citofluorografía. Se muestra en la gráfica la separación de dos poblaciones celulares basadas en su marcaje fluorescente de membrana. En la pantalla del osciloscopio pueden reconocerse de acuerdo a su positividad o a su tamaño.

capacidad para reconocer sus funciones e interacciones moleculares, y ha simplificado con mucho nuestras técnicas de separación y de cultivo celular. Los instrumentos actuales son capaces de identificar tamaño, función y número de células de una muestra, al tiempo que pueden reconocer la cantidad, intensidad de señal y localización de 3 o 4 marcadores moleculares simultáneamente. Con ello, la capacidad de análisis de los inmunólogos, patólogos, hematólogos e infectólogos se ha multiplicado con una rapidez asombrosa en dos décadas.

Otro avance reciente ha sido la incorporación de técnicas radioactivas más versátiles en el reconocimiento de respuestas inmunes, para ser medidas tanto en suero como en células aisladas de sangre periférica o cavidades anatómicas, e incluso del tejido mismo. En un inicio, el radioinmuno-ensayo permitió cuantificar proporciones ínfimas de anticuerpos en la circulación (por ejemplo, IgE en reacciones alérgicas) y reconocer la presencia de diversos antígenos en enfermedades autoinmunes. Al aplicar estas técnicas de marcaje en respuestas celulares, se identificaron fenómenos linfoproliferativos en cultivo o en tejidos extraídos de pacientes con diversas patologías neoplásicas o autoinmunes. Más aún, los procedimientos contemporáneos de inmunohistoquímica han facilitado la identificación *in situ* de antígenos tumorales, variantes celulares en infiltrados inflamatorios o neoplásicos, y de ciertos marcadores moleculares que estiman la precocidad, agresividad o mutabilidad de componentes celulares o de microorganismos.

Llevadas a su potencial clínico más sofisticado, estas estrategias han permitido el diseño de técnicas de citotoxicidad en tumores sólidos, en órganos transplantados o en la localización gamagráfica de abscesos o metástasis. No cabe duda que la contribución de las técnicas inmunológicas ha modificado en unos cuantos lustros nuestra percepción de los procesos fisiopatológicos.

Desde la revolución molecular de la segunda parte del siglo XX, la inmunología ha aprovechado esos avances tecnológicos para aplicarlos al servicio de las enfermedades autoinmunes. Las técnicas de tipificación inmunogenética de individuos con padecimientos de etiología desconocida, se han vistos enriquecidas con la introducción de marcadores

moleculares (oligonucleótidos, secuencias iniciadoras, etc), que paralelamente han permitido la secuenciación e identificación cristalográfica de moléculas de activación o función celular, aquellas implicadas en histocompatibilidad y presentación de antígenos, y otras más responsables de la migración y adhesión de diferentes células entre sí. La utilidad clínica de este enfoque servirá para diseñar futuros tratamientos -menos tóxicos, más específicos- y es, hoy por hoy, la base de la investigación más exitosa para entender y modificar los procesos de salud y enfermedad en la historia de la humanidad.

Referencias

1. **Burnet FM.** A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Australian Journal of Science* 20: 67, 1957.
2. **Rubin LP.** Styles in scientific explanation: Paul Ehrlich and Svante Arrhenius on immunochemistry. *Journal of History of Medicine* 35: 397, 1980.
3. **Reinisch CL, Litman GW.** Evolutionary immunobiology. *Immunology Today* 10:278, 1989.
4. **Wu TT, Kabat EA.** An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *Journal of Experimental Medicine* 132: 211, 1970.
5. **Davies DR, Padian EA.** Antibody-antigen complexes. *Annual Review of Biochemistry* 59: 439, 1990.
6. **Kohler G, Milstein C.** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495, 1975.
7. **Koller BH, Smithies O.** Altering genes in animals by gene targeting. *Annual Review of Immunology* 10: 785, 1992.
8. **Parham P.** Antigen processing. Transporters of delight. *Nature* 348: 674, 1990.
9. **Keegan AD, Paul WE.** Multichain immune recognition receptors: similarities in structure and signalling pathways. *Immunology Today* 13: 63, 1992.
10. **Moss PAH, Rosenberg WMC, Bell JI.** The human T cell receptor in health and disease. *Annual Review of Immunology* 10: 71, 1992.
11. **Lanzavecchia A.** Identifying strategies for immune intervention. *Science* 260: 937, 1993.
12. **Klein G, Klein E.** Evolution of tumors and the impact of molecular biology. *Nature* 315: 190, 1985.
13. **Cournoyer D, Caskey CT.** Gene therapy of the immune system. *Annual Review of Immunology* 11: 297, 1993.
14. **Silverstein AM.** A history of Immunology. San Diego, Academic Press, 1989.
15. **Thomas L.** The youngest science. Oxford, Oxford University Press, 1985.