

La biología molecular en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades respiratorias

X. Busquets^a y A.GN. Agustí

Servicio de Neumología. ^aUnidad de Investigación. Hospital Universitari Son Dureta. Palma de Mallorca.

Introducción

Afrontémoslo de entrada. No podemos escapar a nuestra naturaleza mecánica, formada por engranajes de genes y proteínas, pero sí podemos utilizar el conocimiento de su funcionamiento para nuestro propio beneficio: el diagnóstico y la curación de las enfermedades. Esta perspectiva sienta las bases de la medicina del futuro y constituye la razón del auge extraordinario que ha tenido, está teniendo y, es de prever, tendrá la biología molecular aplicada a la medicina.

Posiblemente, estamos asistiendo a una revolución en el campo del conocimiento médico sin parangón en la historia. Por ello, es un error grave considerar que “la biología molecular es una moda” o “no me afecta en mi práctica profesional”. Los conceptos que de ella se derivan son de tal importancia que, sin duda, cambiarán (de hecho ya lo están haciendo) la forma en que diagnosticamos y tratamos a los pacientes. Es imprescindible, por tanto, que cualquier profesional sea capaz de, como mínimo, entender el lenguaje y los conceptos básicos de esta nueva disciplina. Sin embargo, su implantación en el ámbito médico ha sido tan rápida que muchos de ellos no han podido asimilar su terminología ni sus conceptos básicos, por lo que no pueden valorar sus resultados y aportaciones. Esta revisión pretende contribuir a cubrir esta laguna.

Para facilitar su lectura, se ha dividido en tres partes claramente diferenciadas. La primera repasa la terminología y los conceptos básicos de biología molecular. La segunda describe las técnicas de laboratorio más frecuentemente utilizadas. La tercera discute algunos ejemplos representativos de patología del aparato respiratorio en los que la aplicación de estos conceptos y técnicas de biología molecular ha facilitado (o, es de prever, facilitará) su diagnóstico y tratamiento. Finalmente, esta revisión incorpora un diccionario terminológico que, esperamos, facilite su lectura y comprensión. La

bibliografía también se ha separado en dos partes, en función de que se trate de lecturas de tipo general (en las que se pueden ampliar los conceptos expresados en las partes I y II) o referencias bibliográficas concretas (parte III).

Parte I. Conceptos fundamentales

Las técnicas de biología molecular disponibles hoy día permiten aislar, amplificar, manipular y secuenciar el ácido desoxirribonucleico (ADN). Esto facilita la investigación de aquellas piezas de la maquinaria celular que se activan (o reprimen) para permitir que la información genética almacenada en el ADN dirija, a través del ácido ribonucleico mensajero (ARNm), la síntesis de proteínas. Esto contribuye a desvelar los mecanismos íntimos de cómo la vida cambia, se adapta y evoluciona. Este concepto de adaptación celular es fundamental. Es fácil comprender que la información genética contenida en el ADN es la causante de una serie de características orgánicas (fenotipo) que, en principio, son inmutables a través de la vida (sexo, talla, color de los ojos, etc.). Sin embargo, la extraordinaria importancia de la información genética del ADN radica en que permite que cada una de nuestras células (y, por tanto, nosotros mismos como organismos) se adapte a circunstancias ambientales o microambientales cambiantes (hipoxia, temperatura, pH, nutrientes, inflamación, etc.). Sin esta capacidad de adaptación celular, moriríamos rápidamente. Esta capacidad depende de que un gen se exprese (active) o no (véase más adelante) en un momento determinado y en unas condiciones ambientales (microambientales) concretas. En definitiva, es esta extraordinaria capacidad plástica la que permite la vida.

Estructura del ADN

El ADN está constituido por una doble cadena de ácido desoxirribonucleico, enrollada sobre sí misma en forma de doble hélice (fig. 1). Cada hebra de ADN está compuesta por la secuencia variable de cuatro nucleótidos distintos (adenina [A], timina [T], guanina [G] y citosina [C]). La secuencia de nucleótidos de una hebra determina la de la otra, ya que cada una de estas cuatro

Correspondencia: Dr. A.GN. Agustí.
Servicio de Neumología. Hospital Universitari Son Dureta.
Andrea Doria, 55. 07014 Palma de Mallorca.

Recibido: 16-12-97; aceptado para su publicación: 30-12-97.

Este estudio ha sido subvencionado, en parte, por ABEMAR.

(Arch Bronconeumol 1998; 34: 256-265)

bases nitrogenadas se une de forma específica sólo con otra base nitrogenada determinada (pares de bases). Así, las adeninas de una cadena se unen (mediante enlaces puentes de hidrógeno) sólo con las timinas de la otra cadena (y las guaninas de una cadena sólo con las citosinas de la otra) (fig. 1). Este apareamiento específico de los nucleótidos se denomina *complementariedad*.

El ADN se encuentra en el núcleo celular, extremadamente empaquetado en forma de *chromosomas*. Cada cromosoma es una molécula de ADN enrollada junto a una serie de proteínas (*histonas*). El conjunto de ADN e histonas se denomina *nucleosomas*. En las mitocondrias existe otra molécula de ADN (ADNmit). Es una molécula de forma circular, mucho más pequeña que la existente en el núcleo. En general, si no se menciona lo contrario, al hablar de ADN (o genoma) suele estarse refiriendo al ADN nuclear.

¿Qué es un gen?

Un *gen* es una secuencia (trozo) de ADN que codifica (contiene información necesaria para producir) una proteína determinada. Todas nuestras células somáticas poseen los mismos cromosomas y, por tanto, la misma secuencia de ADN (genes). Es decir, todas nuestras células poseen el mismo potencial genético. Sin embargo, no todos estos genes están activados (expresados) simultáneamente en todas las células. La expresión de diferentes genes en diferentes células y, en la misma célula, la expresión de diferentes genes a lo largo del tiempo, concede a nuestro organismo una plasticidad extraordinaria y una gran capacidad de adaptación. Al mismo tiempo, sin embargo, esta extraordinaria complejidad genética nos hace muy vulnerables al error. De hecho, se producen errores constantemente. Gracias a un complejo sistema de reparación genética, generalmente estos errores no tienen mayores consecuencias. Sin embargo, cuando el número de errores es muy elevado y/o los sistemas de reparación fallan, se produce la enfermedad (por ej., cáncer) (véase más adelante).

Estructura y función de los genes

El tamaño de los genes (longitud de la secuencia de nucleótidos) es muy variable. Puede oscilar desde algunos cientos de nucleótidos (pares de bases) a varios miles, dependiendo del tamaño de la proteína que codifica y de las secuencias reguladoras contenidas en su interior, ya que un gen contiene dos tipos de áreas o bloques de información diferentes (fig. 2): los exones, cuya secuencia de nucleótidos codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína final (véase más adelante), y los intrones, que son secuencias de nucleótidos intercaladas entre los exones que no codifican proteínas.

Transcripción y ARNm

La transcripción es el proceso de transferencia de información de la molécula de ADN a la de ARNm mediante la acción de la ARN polimerasa (fig. 3). La ARN

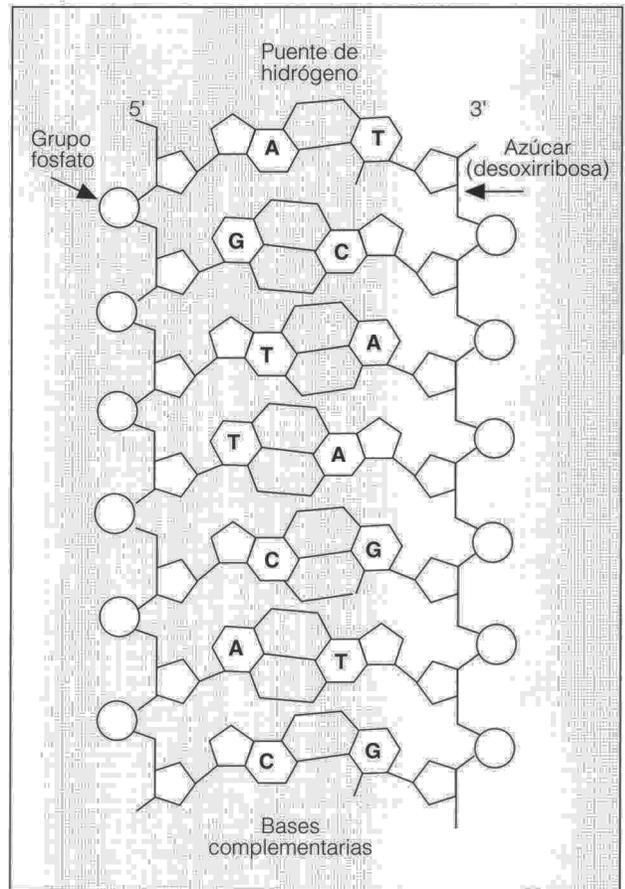


Fig. 1. Estructura básica del ADN. El ADN está formado por dos cadenas en forma de α -hélice antiparalelas (paralelas y en direcciones opuestas). Estas cadenas están formadas por azúcares (desoxirribosa) unidas por un enlace fosfato. Los azúcares a su vez se unen a las bases o nucleótidos: adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C). Las bases complementarias (A-T) y (G-C) de las distintas cadenas están unidas a su vez por enlaces puente de hidrógeno.

polimerasa sintetiza una cadena de ARN complementaria del ADN (ARN primario), en la que las timinas (T) se sustituyen por uracilos (U). Este proceso continúa hasta que la ARN polimerasa se encuentra con una secuencia de nucleótidos denominada "secuencia de terminación" (ATT, ACT o ATC).

Poco antes de las secuencias de terminación, el ADN contiene una larga repetición de timinas (hasta centenas de ellas). Esta secuencia de timinas se transcribirá en el ARN primario en forma de una larga cola de adeninas (*poly* [A]). La función de la zona *poly* (A) es estabilizar el ARN primario. Por otra parte, la cadena de ARN primario sufrirá el denominado proceso de *capping*, que consiste en incorporar en su extremo 5' una molécula de 7-metil-guanosina. El proceso de *capping* es esencial para la síntesis de proteínas (traducción).

Para que se inicie la transcripción se requiere que unas proteínas denominadas factores de transcripción se unan al ADN en las denominadas secuencias promotoras, específicamente en unos elementos reguladores denominados bloque TATA y bloque CAAT (fig. 2

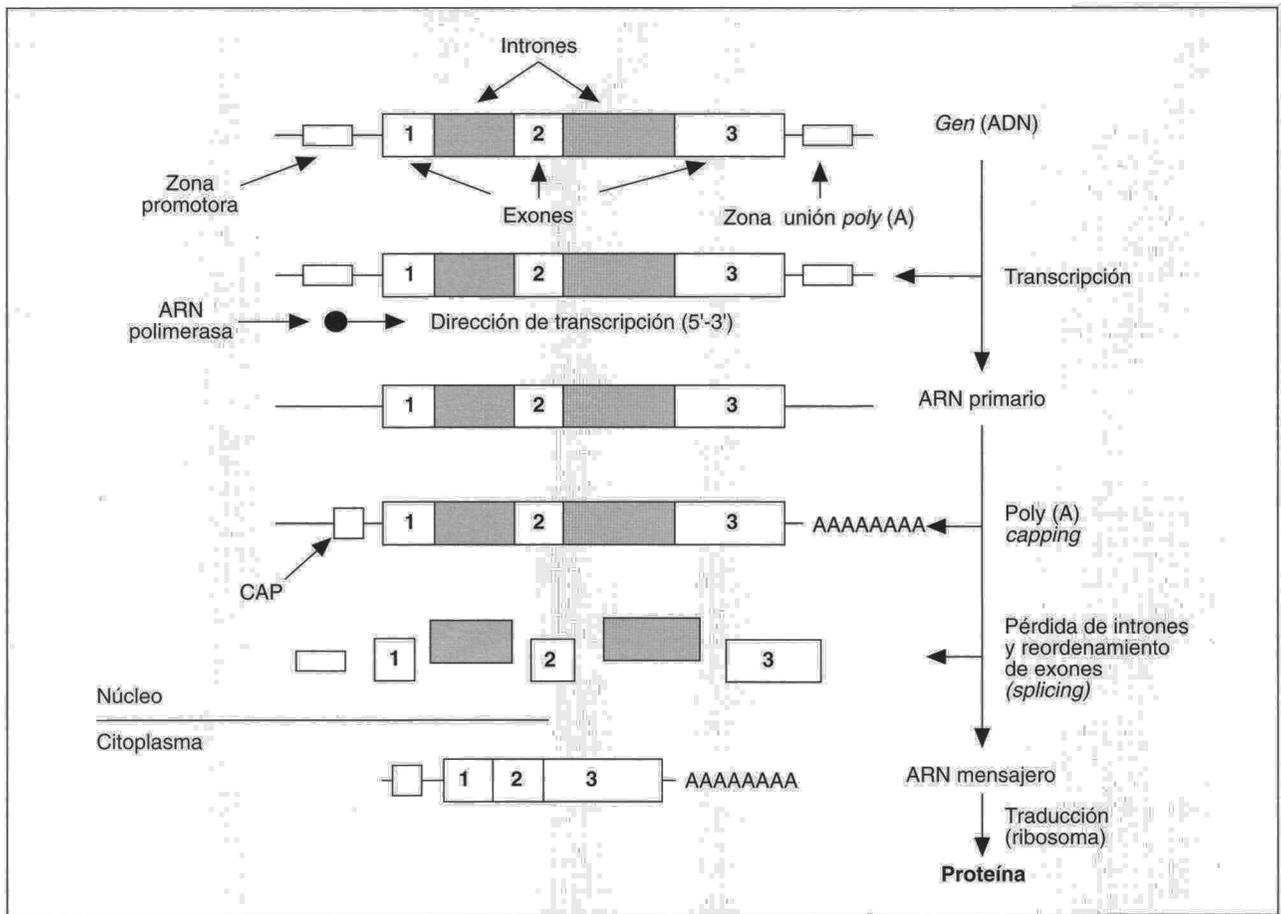


Fig. 2. Estructura y función de un gen. Un gen (ADN) está compuesto por intrones (secuencias que codifican para aminoácidos) y exones (secuencias que no codifican), flanqueados por zonas promotoras y reguladoras de la transcripción, y por secuencias de unión de poly (A) y de terminación de la transcripción. La transcripción (síntesis de ARN) tiene lugar en el núcleo y se inicia con la unión de la ARN polimerasa a la zona promotora, produciéndose un ARN primario. La unión de un residuo de 7-metil-guanosina en su extremo 5' (*capping*) y de la cola de adeninas (*poly A*), junto al reordenamiento de los exones y pérdida de los intrones genera el ARN mensajero (ARNm). El ARNm se une en el citoplasma a los ribosomas, sintetizando las proteínas (véase fig. 4).

y 3). Ambos bloques (TATA y CAAT) están situados a decenas de nucleótidos de distancia de la zona de inicio de la transcripción (fig. 3). Mucho más alejados (a centenares o miles de nucleótidos) se encuentran otros elementos reguladores denominados "aumentadores" (*enhancers*) (fig. 3). Estos elementos aumentadores pueden modular la transcripción positiva o negativamente.

La función principal del ARN es servir de modelo (*template*) para la síntesis de proteínas en los ribosomas citoplasmáticos (traducción) (fig. 4). Sin embargo, antes de que el ARN primario que resulta del proceso de transcripción pueda cumplir esta función, debe sufrir una serie de modificaciones que lo transformarán en la molécula final de ARN mensajero (ARNm) (fig. 2). Estas modificaciones (que aún tienen lugar en el núcleo) consisten en la pérdida de los intrones y la reunión de los exones (*splicing*). Una vez en su forma final, la molécula de ARNm migra desde el núcleo hasta el citoplasma celular, donde se encuentran los ribosomas encargados de la síntesis proteica.

Traducción y síntesis proteica

La secuencia de bases de la molécula de ARNm se emplea para generar una secuencia lineal y específica de aminoácidos (proteína). Este proceso se denomina traducción y tiene lugar en los ribosomas del citoplasma celular (fig. 4). Los ribosomas generalmente se encuentran unidos (polirribosomas) y asociados al retículo endoplásmico, formando el retículo endoplásmico rugoso.

En el ribosoma, la secuencia de nucleótidos del ARNm es "leída" por una molécula especial de ARN denominada ARN de transferencia (ARNt) (fig. 4). El ARNt reconoce al ARNm en conjuntos de tres bases (nucleótidos) denominados tripletes o codones (fig. 4). Cada codón codifica (contiene información para la síntesis de) un aminoácido de la proteína. Este código (triplete = aminoácido) se denomina código genético. Hay 64 posibles combinaciones de A, G, C, U y, en consecuencia, 64 posibles tripletes. Sin embargo, sólo existen 20 aminoácidos. Por tanto, distintos tripletes deben codificar para un mismo aminoácido. Existen además tres

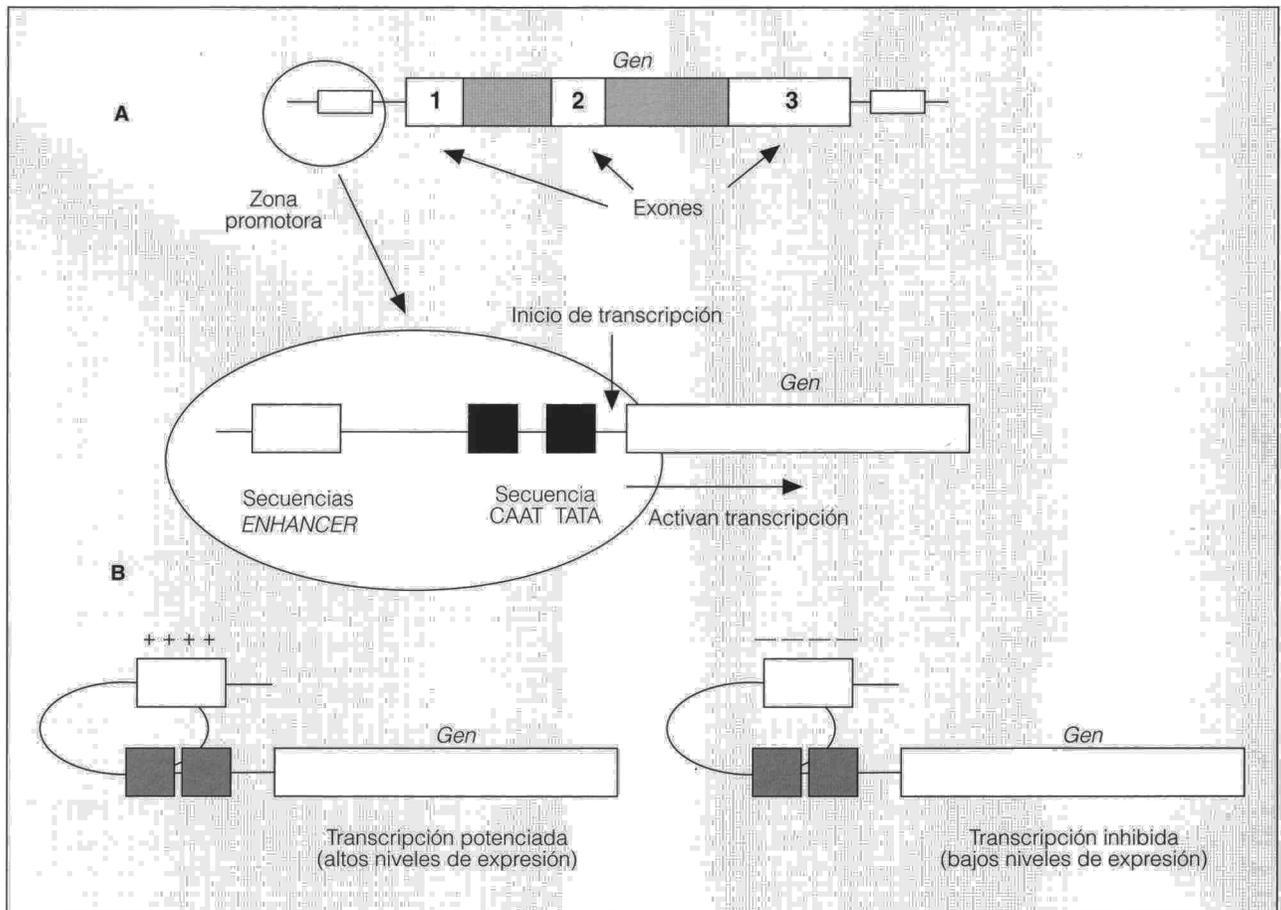


Fig. 3. Zonas promotoras y enhancers. Los genes están flanqueados por zonas promotoras y reguladoras de la transcripción. Estas secuencias se encuentran organizadas en bloques (*box*). Panel A: existen dos familias fundamentales de secuencias promotoras: CAAT *box* y TATA *box*. Estas secuencias se caracterizan por tener abundantes repeticiones de las combinaciones CAAT y TATA. A estas secuencias se unen unas proteínas denominadas factores de transcripción que estimulan la unión de la ARN polimerasa. Panel B: en zonas alejadas linealmente del gen (aunque cercanas espacialmente) existen secuencias denominadas *enhancers*, cuya función es modular tanto positiva como negativamente la transcripción.

tripletes que no codifican para ninguno (UAA, UAG y UGA); su función es detener el proceso de traducción.

Parte II. Técnicas de laboratorio

Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción (endonucleasas) son enzimas de origen bacteriano que permiten cortar y volver a pegar fragmentos de ADN en lugares predeterminados, posibilitando así la génesis de nuevas secuencias de ADN a nuestra conveniencia. Las enzimas de restricción también permiten obtener secuencias de nucleótidos con fragmentos de ADN procedentes de distintas especies (quimeras). Existen centenares de enzimas de restricción disponibles comercialmente. Su uso ha revolucionado las técnicas de biología molecular.

Hibridación. Southern y Northern blot

La hibridación consiste en el apareamiento específico de bases complementarias entre distintas moléculas de

ácidos nucleicos. Las aplicaciones más conocidas de la hibridación son las técnicas de Southern y Northern blot. Ambas están basadas en la capacidad de un fragmento de ADN (sonda) para "buscar", "encontrar" y "fijarse" (hibridar) en un fragmento complementario de ADN (Southern) o ARNm (Northern).

En ambas técnicas, el ADN (tras digestión con enzimas de restricción) o el ARNm se someten a electroforesis (desplazamiento producido por un campo eléctrico) en un gel de agarosa para separar los distintos fragmentos en función de su tamaño (fig. 5). Estos fragmentos se transfieren a una membrana de nitrocelulosa-nailon que, a continuación, se baña en una solución de hibridación que contiene la sonda de interés (fig. 5). Esta sonda está marcada mediante un nucleótido radiactivo o un marcador fluorescente (biotina, fluoresceína, digoxigenina, etc.). La especificidad de la unión se puede modular alterando la "estringencia" de la hibridación. Para ello, se modifica la concentración de sal de la solución de hibridación y/o la temperatura a la que ésta se realiza. Condiciones de hibridación de alta estringencia

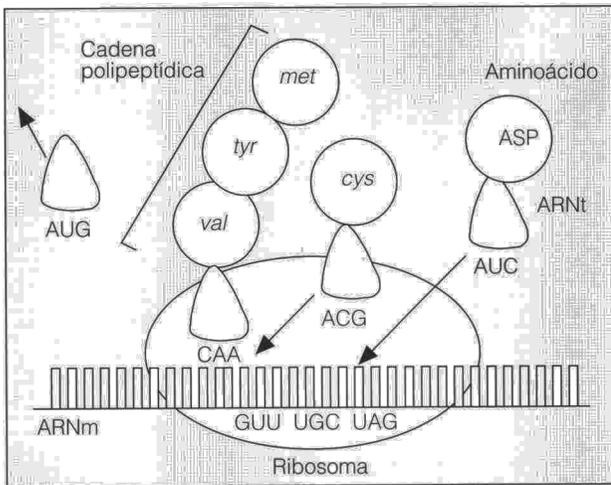


Fig. 4. Síntesis de proteínas (traducción). El ARNm se une a los ribosomas en el citoplasma celular. El ribosoma actúa como un soporte que asocia el ARNm con los ARN de transferencia (ARNt). La asociación se produce al interactuar 3 bases específicas del ARNm (codón), con 3 bases complementarias del ARNt (anticodón). Cada ARNt lleva unido un aminoácido distinto. La correlación de cada 3 bases (tripleto) del ARNm que codifican para un aminoácido (existen 20) se denomina código genético.

cia pueden identificar secuencias que se diferencian sólo en un nucleótido, mientras que condiciones de baja estrictancia permiten identificar nuevas secuencias de ADN (genes) parecidos (“emparentados”) con la sonda empleada. Al finalizar el período de hibridación, la membrana se seca y se expone a una película radiográfica. El ADN (o ARNm) detectado por la sonda aparecerá como una banda (fig. 5). La intensidad de la señal

resultante será proporcional a su concentración inicial, y su posición en la membrana tendrá relación con su peso molecular (cuanto más pequeño sea éste, mayor será el espacio recorrido en el gel) (fig. 5).

Hibridación in situ

Las secuencias de ADN (o ARNm) también pueden localizarse directamente en muestras de tejido mediante hibridación *in situ*. En este caso, el tejido objeto de estudio se fija y baña en una solución de hibridación semejante a la descrita en el apartado anterior. La ventaja que ofrece esta técnica es que permite la localización precisa en el tejido de una secuencia determinada de ADN (o ARNm) y, por tanto, la identificación del tipo celular que expresa esa secuencia.

Western blot

La técnica del Western blot permite evaluar la cantidad existente de una proteína concreta en una muestra determinada. Es similar a la técnica de Southern y Northern blot, aunque no se basa en la hibridación de ácidos nucleicos. Consiste en realizar un extracto de todas las proteínas del tejido y separarlas por su peso molecular mediante electroforesis en gel de acrilamida y SDS (dodecil sulfato sódico). Las proteínas se transferirán posteriormente a una membrana de nitrocelulosa. La proteína a determinar se detecta mediante un anticuerpo específico (anticuerpo primario). Este anticuerpo primario será detectado a su vez mediante otro anticuerpo marcado radiactivamente o con fluorescencia (anticuer-

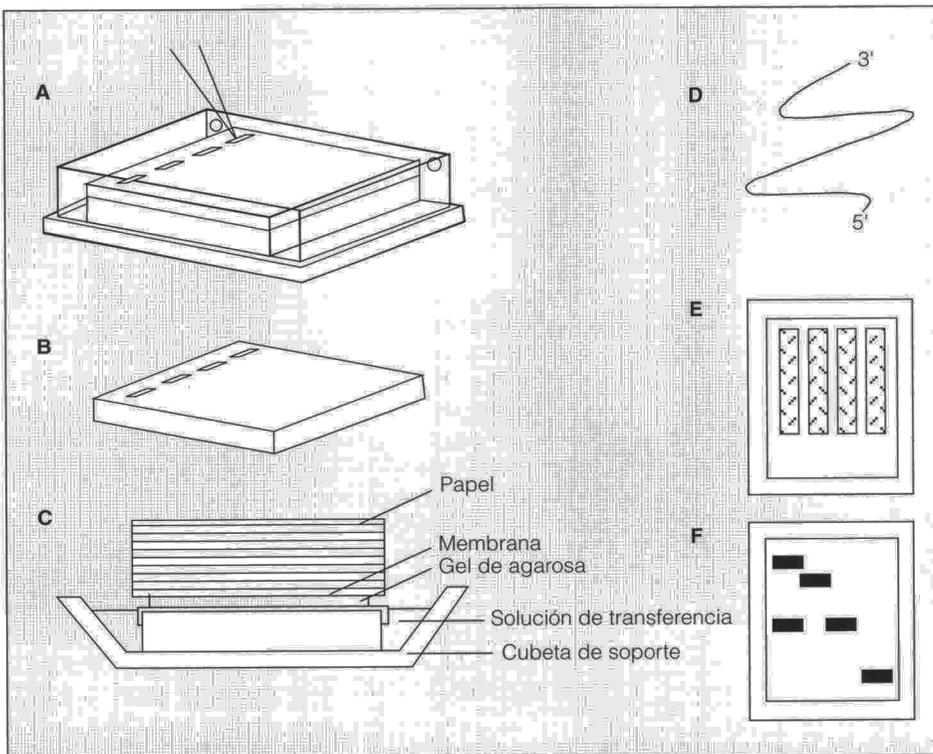


Fig. 5. Southern y Northern blot. Tanto el ARN como el ADN (éste previamente digerido con enzimas de restricción) pueden separarse en especies de distinto peso molecular mediante electroforesis (A) en gels de agarosa o acrilamida (B). Los ácidos nucleicos así separados son transferidos a una membrana de nitrocelulosa-nailon por capilaridad (C). La membrana es incubada en una solución de hibridación que contiene una sonda (ADN o ARN) marcada radiactivamente o por fluorescencia (D). La sonda hibridará con las cadenas complementarias del ADN o ARN transferidas a la membrana (E). La exposición de la membrana a una película de autoradiografía detectará en forma de bandas las especies de ADN o ARN que hayan hibridado. La intensidad de la banda indica la cantidad existente de la molécula de interés y su posición relativa en el gel expresa su peso molecular.

po secundario). Al igual que se ha descrito anteriormente para el Southern o Northern blot, las membranas se expondrán a una película de autorradiografía y la proteína se detecta en forma de banda, cuya intensidad es proporcional a su cantidad y su posición a su peso molecular (fig. 6).

Polimerasas y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las polimerasas son complejos enzimáticos que dirigen la replicación (duplicación) de una molécula de ADN. Existen tres tipos fundamentales de polimerasas: ADN polimerasas, ARN polimerasas y transcriptasa inversa. La ADN polimerasa replica una molécula de ADN a partir de otra molécula de ADN. La ARN polimerasa replica una molécula de ARN a partir de otra de ADN (fig. 2). La transcriptasa inversa (obtenida a partir de retrovirus) permite obtener una copia de ADN (cADN) a partir de una molécula de ARNm.

El empleo de ADN polimerasa constituye la base de la conocida reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica permite amplificar secuencias de ADN a partir de una sola molécula de ADN y obtener más de un millón de copias. La PCR también permite amplificar ARN (RT-PCR) si previamente se emplea transcriptasa inversa para generar cADN a partir de ARNm. Brevemente, la PCR consiste en la repetición de varios ciclos de calor (termociclar) que separan las dos cadenas de ADN (desnaturalizar). A continuación, se añade ADN polimerasa, nucleótidos y cebadores (*primers*), y se inicia un ciclo de polimerización a la temperatura óptima de hibridación de los *primers*. La secuencia de ADN (o de cADN) que se quiera amplificar debe ser conocida *a priori*, ya que los *primers* deben hibridar de forma específica en la zona de la molécula de ADN a amplificar, y permitir así la acción de la ADN polimerasa. Además, esta enzima debe ser resistente a la temperatura, ya que de otra forma se inactivaría por efecto de la misma (por ej., Taq-polimerasa).

Secuenciación y clonación

Secuenciar ADN consiste en identificar la secuencia lineal de nucleótidos que lo componen (fig. 1). Su utilidad radica en que, aplicando el código genético (véase antes), la secuenciación de bases de un gen permite conocer la estructura de la proteína que codifica (secuencia de aminoácidos).

La clonación permite replicar múltiples fragmentos idénticos de una secuencia de ADN determinada. La técnica básica de clonación consiste en insertar (mediante enzimas de restricción) la secuencia de ADN de interés en un plásmido (molécula de ADN bacteriana autorreplicativa). Este plásmido, conteniendo la secuencia de interés, se introduce en una bacteria (*E. coli*) que lo acepta en su interior y permite su replicación. Las bacterias se cultivan utilizando los métodos habituales del laboratorio de microbiología; al dividirse, los plásmidos se replican en su interior. Cuando se ha conseguido una colonia bacteriana lo suficientemente grande, se

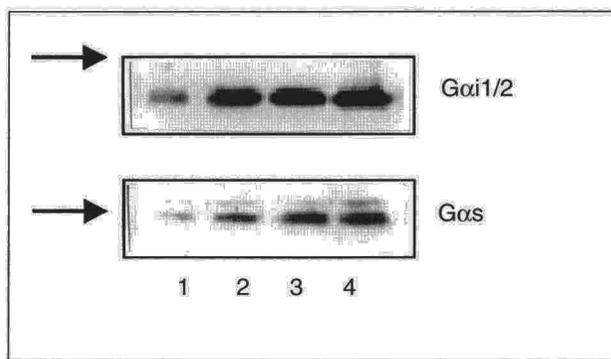


Fig. 6. Western blot. Ejemplo representativo de Western blot en neutrófilos humanos para las proteínas del sistema de transducción de señales $G\alpha i/2$ y $G\alpha s$ (proteínas G). Obsérvese que la intensidad de la señal es representativa de la cantidad de proteínas separadas (línea 1: 5 μ g; línea 2: 10 μ g; línea 3: 20 μ g y línea 4: 30 μ g). La posición relativa de las bandas indica su peso molecular. Las flechas indican la posición de un marcador de peso molecular (ovoalbumina de 47 kD) separado junto a las proteínas G.

aíslan los plásmidos y se liberan (mediante enzimas de restricción) las múltiples copias de la secuencia clonada. Alternativamente, la colonia bacteriana puede utilizarse como sistema de almacenamiento de la secuencia clonada, ya que puede guardarse congelada a -80°C durante años, sin pérdida de la viabilidad bacteriana o del plásmido.

Las técnicas de secuenciación y clonación han permitido determinar la estructura primaria de la proteína (secuencia de aminoácidos), producirla en grandes cantidades y realizar mutaciones dirigidas a aminoácidos específicos (*point mutation*). Con ello, se ha podido examinar como la variación de distintos dominios (zonas) de la proteína modifican su función.

Terapia genética

Los avances en el conocimiento de las bases moleculares de la expresión genética han desarrollado el potencial técnico suficiente para poder interferir y modificar terapéuticamente los distintos pasos que regulan la expresión de una proteína cuya malfunción esté en el origen de una enfermedad determinada. Conceptualmente, la terapia genética supone insertar el gen correcto en el tejido afectado, en sustitución del gen defectuoso. Para la inserción del gen existen diversas técnicas. La transfección física utiliza, entre otros métodos, liposomas (vesículas lipídicas) para empaquetar la secuencia de ADN a insertar en el tejido o célula diana. Los liposomas se fusionan con las membranas celulares y liberan en su interior la carga genética (ADN) que contienen. Se puede aumentar la especificidad de transfección en un determinado tipo celular del tejido si la secuencia de ADN que se pretende transferir se acopla a un ligando que sólo sea reconocido por aquellos tipos celulares que posean el receptor adecuado para dicho ligando. En cualquier caso, la expresión del nuevo ADN introducido mediante medios físicos no es estable a lo largo del tiempo, por lo que eventualmente ese gen dejará de transcribirse. Por el contrario, los métodos de transfección viral permiten que, una vez infectada la célula, el

gen de interés se incorpore de manera estable al genoma celular. Para ello, estos métodos utilizan retrovirus modificados genéticamente para evitar que exista síntesis de proteínas virales o replicación viral. En cambio, el genoma de estos virus contiene una o varias copias del ARN del gen de interés, el gen de la transcriptasa inversa y los genes que regulan los elementos de control de la transcripción. Con todo ello se facilita la expresión estable del gen insertado.

Parte III. Aplicaciones prácticas

Enfermedades infecciosas

Las técnicas de biología molecular son potencialmente útiles en el ámbito de la patología infecciosa porque permiten:

1. *Identificar en el organismo (bacteria o virus) causante de una infección pulmonar.* Para ello basta detectar en el tejido infectado las secuencias de ADN específicas del agente causal. Pueden emplearse técnicas de hibridación (Northern o Southern blot) o PCR. En el primer caso se necesita una muestra relativamente abundante (mg) de tejido; en el segundo, la PCR permite identificar los genes del agente infeccioso con cantidades de tejido muy pequeñas. La PCR se ha utilizado con éxito para detectar bajísimas concentraciones de *Legionella pneumophila* en agua de bebida^{1,2}.

2. *Acelerar el proceso diagnóstico.* La realización de los métodos de identificación bacteriológica o viral tradicionales consume mucho tiempo y, en algunos casos, es cara. La PCR puede contribuir a solucionar este problema porque permite amplificar con rapidez (minutos) pequeñas cantidades de ADN del agente causal. Esta técnica se ha utilizado con éxito en el diagnóstico de infecciones producidas por bacilo de Koch³, *Pneumocystis carinii*⁴, *Mycoplasma pneumoniae*⁵ y diversos virus respiratorios, incluyendo adenovirus, virus del herpes simple y citomegalovirus⁶.

3. *Identificar fuentes de infección.* En estudios epidemiológicos es importante identificar el origen de una epidemia con objeto de poder intervenir de forma eficaz. La práctica de un mapa de restricción facilita esta tarea. Esta técnica consiste en cultivar la bacteria de interés (obtenida de cada uno de los posibles focos), aislar su ADN y tratarlo con enzimas de restricción. Estas enzimas fragmentarán el ADN en lugares distintos, dependiendo de la secuencia de cada genoma bacteriano. Los fragmentos resultantes (*fragmentos de restricción*) pueden separarse mediante técnica de Southern. El empleo de sondas específicas permite identificar la posición relativa de ciertas especies de ADN y obtener un mapa de restricción característico para cada bacteria. La comparación de mapas de restricción de cepas aisladas en distintos lugares (aire acondicionado, agua de bebida, etc.) lo que facilita la identificación del origen de la infección⁷.

4. *Determinar la expresión de genes importantes en la patogénesis de la enfermedad* (p. ej., los que codifican para toxinas)^{8,9} o identificar secuencias de plásmidos que confieren resistencia a antibióticos¹⁰.

Cáncer de pulmón

La biología molecular y el estudio del cáncer son dos disciplinas íntimamente ligadas. Por una parte, la biología molecular ha ampliado de forma considerable nuestro conocimiento de los mecanismos celulares que producen la transformación celular maligna. Por otra parte, el estudio de las causas moleculares del cáncer ha impulsado el desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular.

El cáncer se produce, fundamentalmente, por una alteración de los mecanismos genéticos que regulan la división y diferenciación celular. Los genes implicados en su patogénesis se pueden agrupar en tres grandes grupos:

1. *Oncogenes dominantes*, cuya sobreexpresión produce la transformación maligna. Utilizando PCR se ha amplificado ADN de tumores pulmonares y se ha observado que, en muchos casos, existe una mayor expresión de oncogenes dominantes (o de sus mutaciones). Una de las familias de oncogenes más estudiada es la familia *ras* (*N-ras*, *Ha-ras* y *Ki-ras*). En condiciones normales, estos genes codifican unas proteínas de bajo peso molecular (21 kD) que regulan el sistema de transducción de señales de los mecanismos de control de la división celular. Sus mutaciones permiten la proliferación celular desordenada. Otra familia de oncogenes que se sobreexpresa en el cáncer de pulmón es la familia *myc* (*c-myc*, *N-myc* y *L-myc*). Estos genes codifican factores de transcripción para genes relacionados con la proliferación celular. Otros oncogenes similares (también factores de transcripción) asociados a cánceres de pulmón son *c-myc* y *c-jun*.

2. *Oncogenes recesivos (genes supresores de tumores o antioncogenes)*. Su inactivación permite la desregulación de la división celular. El primer gen supresor de tumores identificado fue el gen del retinoblastoma (*Rb*). En un 90% de los tumores de pulmón de célula pequeña, el *Rb* está completamente ausente^{11,12}. Otro antioncogén de gran importancia en el cáncer de pulmón es el *p53*, que codifica un factor de transcripción^{13,14}. La introducción del gen de *p53* nativo (no mutado) en células de carcinoma de colon suprime completamente su crecimiento neoplásico¹⁵.

3. *Genes que codifican factores de crecimiento o sus receptores*. La disfunción de este tipo de genes desempeña un papel muy relevante en el proceso de carcinogénesis. Por ejemplo, en ciertos cánceres de pulmón se han identificado factores de crecimiento (transferrina, factor de crecimiento I parecido a insulina [IGF-1] y factor de crecimiento epidérmico [EGF]) que pueden actuar de forma autocrina, es decir, que pueden actuar sobre la propia célula neoplásica que los produce, estimulando su división¹⁶⁻¹⁸.

Asma bronquial

La inflamación bronquial es un componente fundamental en el asma bronquial. En consecuencia, el estudio de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen en esta inflamación es de gran relevancia para la

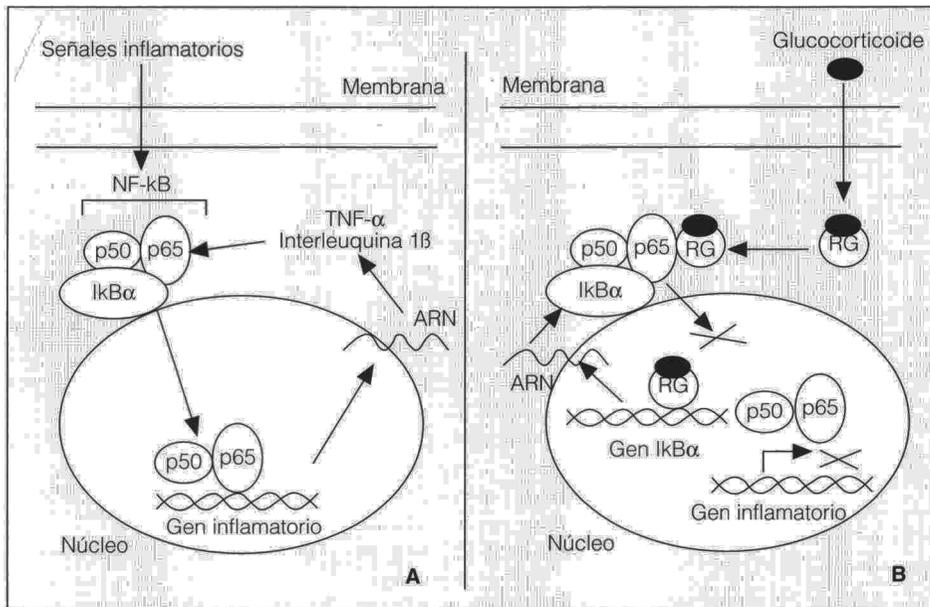


Fig. 7. Panel A: Las señales inflamatorias (citocinas, virus, radicales oxidantes, etc.) activan la transcripción de genes inflamatorios (proteínas inflamatorias, moléculas de adhesión, TNF- α , interleucinas, etc.) mediante el factor de transcripción NF- κ B (compuesto por las subunidades p50 y p65). Normalmente, NF- κ B está unido a I κ B α , proteína que impide su translocación al núcleo. Las señales inflamatorias fosforilan I κ B. Esta fosforilación activa la degradación de I κ B y permite la translocación al núcleo (donde actúa) de NF- κ B. Panel B: mecanismo molecular de acción de los corticoides. Los corticoides inactivan NF- κ B mediante dos vías: a) el receptor glucocorticoide (RG) inactiva directamente NF- κ B uniéndose a la subunidad p65 e impidiendo su translocación al núcleo, y b) el RG activado actúa como factor de transcripción, promoviendo la síntesis de I κ B α y dificultando aún más la acción de NF- κ B.

mejor comprensión de la enfermedad y para el desarrollo de alternativas terapéuticas más eficaces. El estudio de diversas citocinas y factores de transcripción nuclear se considera básico en este contexto.

Una citocina es una proteína producida por diversas células inflamatorias (tras el estímulo adecuado) y que ejerce su acción sobre otra célula (diana) a través de un receptor específico existente en dicho tejido diana. En función de la ubicación de este último se diferencian efectos autocrinos (actúan sobre la misma célula que produce la citocina), paracrinos (actúa sobre una célula vecina, cercana), o endocrinos (actúa sobre una célula diana que está situada a gran distancia de la célula productora; se precisa que la citocina circule a través del torrente sanguíneo). Existen muchas citocinas. Algunas de las más conocidas son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la familia de las interleucinas (IL) de las que, actualmente, se conocen al menos 12 tipos (IL-1, IL-2, etc.). Aunque la biología molecular ha incrementado notablemente el conocimiento del papel de las citocinas en las enfermedades inflamatorias, debido a su extrema complejidad todavía quedan muchos aspectos por definir. Es de prever que en el futuro puedan utilizarse citocinas recombinantes (citocinas humanas o sus receptores clonados en plásmidos bacterianos para su producción masiva), anticuerpos anticitocinas o implantación genética de oligonucleótidos antisentido como estrategias para el control terapéutico de los procesos inflamatorios. Un oligonucleótido antisentido [*antisense*] es una copia de ADN complementaria pero de sentido contrario al del ARNm que codifica para la proteína defectuosa a inactivar. Al ser introducido en la célula, este oligonucleótido antisentido hibridará con su ARNm e impedirá su traducción (producción de la proteína defectuosa).

El estudio del papel de los factores de transcripción nuclear es otra área de investigación relevante en el ám-

bito de las enfermedades inflamatorias del pulmón. En este campo destaca el denominado factor nuclear- κ B (NF- κ B). NF- κ B está compuesto por varias subunidades proteicas (heterodímero)¹⁹, entre las que destacan p50 y p65 (fig. 7, panel A). En condiciones normales, el complejo NF- κ B se localiza en el citoplasma celular, ligado a otra proteína (I- κ B) que impide su translocación (migración) al núcleo (fig. 7, panel A). Cuando se produce una señal de activación determinada (citocina radicales libres O₂), un tipo de enzima determinado (cinasa) fosforila I- κ B, que se degrada y permite que NF- κ B se dirija hacia el núcleo (fig. 7, panel A), donde, como todos los factores de transcripción, se fija en las regiones promotoras de los genes sobre los que actúa (fig. 3). De esta forma, NF- κ B estimula la expresión de muchas de las moléculas involucradas en la cascada inflamatoria, como nuevas citocinas, y moléculas de adhesión¹⁹ que, a su vez, modulan la relación NF- κ B/I- κ B (fig. 7, panel A).

Los corticoides deben sus efectos antiinflamatorios a su acción sobre NF- κ B y otros factores de transcripción nuclear, como el factor de transcripción AP-1 (*c-fos* y *c-jun*)^{20,21}. Los corticoides se unen a su receptor específico (localizado en el citoplasma celular) y lo activan (fig. 7, panel B). El receptor activado se une al complejo NF- κ B (o AP-1) e inhibe su translocación al núcleo²²⁻²⁵ (fig. 7, panel B). Por otra parte, los corticoides incrementan la transcripción de I- κ B, por lo que, al aumentar la fijación de NF- κ B, también se impide su translocación al núcleo²⁶ (fig. 7, panel B). Todo ello tiene como consecuencia la disminución de la expresión de diversos genes implicados en la respuesta inflamatoria (citocinas, moléculas de adhesión, etc.). Actualmente, NF- κ B es un objetivo potencial para el desarrollo de nuevos agentes antiinflamatorios que intenten obviar los efectos secundarios indeseables asociados al tratamiento crónico con corticoides.

Fibrosis quística. Terapia genética

Las técnicas de terapia genética son, sin duda, la base de la medicina del futuro, ya que presenta un gran potencial para la prevención y corrección de muchas enfermedades. El progreso de este tipo de estrategia terapéutica depende actualmente de la solución de los problemas de seguridad que comporta y de la mejora de la especificidad de inserción del material genético sólo en las células en las que es necesario. Sin embargo, la terapia genética ya ha empezado a ensayarse en algunas enfermedades humanas, como la fibrosis quística (FQ). La FQ se caracteriza por la mutación de un canal de cloro (CFTR) en la membrana celular. La introducción del gen normal (que codifica para el canal cloro no mutado) en cultivos de células epiteliales humanas obtenidas de pacientes con FQ es capaz de corregir la función anormal del canal²⁷⁻²⁹. Su eficacia clínica deberá ser evaluada en ensayos clínicos controlados pero, sin duda, este tipo de tecnología abre posibilidades terapéuticas hasta ahora insospechadas para estos enfermos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los doctores B. Togores, J. Saulea y F. Barbé (Servicio de Neumología, Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca) la lectura crítica del manuscrito, sus comentarios y sugerencias.

Diccionario terminológico básico

Antioncogén: gen cuya inactivación desregula la división celular produciendo un fenotipo maligno.

ARN: ácido ribonucleico.

ARN de transferencia (ARNt): molécula especial de ARN ligada a un aminoácido que se une mediante un triplete de nucleótidos a un codón complementario en el ARNm para sintetizar proteínas.

ARN mensajero (ARNm): molécula de ARN que sirve de modelo para la síntesis de proteínas en el ribosoma.

ARN polimerasa: enzima que cataliza la síntesis de ARN a partir de ADN.

cADN: molécula de ADN sintetizada a partir de ARNm.

clonación: introducción de moléculas de ADN en bacterias para sintetizar copias idénticas.

código genético: combinación de tripletes de nucleótidos que codifican para los aminoácidos.

codón: tres nucleótidos consecutivos que codifican para un aminoácido o una señal funcional (inicio, terminación, *splicing*).

complementariedad: unión mediante puentes de hidrógeno de dos bases homólogas de cadenas opuestas de ADN.

elemento: secuencia de ADN con una función reguladora de la transcripción.

enhancer: secuencia de ADN con una función reguladora de la expresión genética. Similar a elemento.

enzima de restricción: enzima bacteriana que reconoce y corta secuencias específicas de ADN de doble cadena. Similar a endonucleasa.

estringencia: condición en la hibridación de ácidos nucleicos que aumenta la especificidad de la unión.

exón: secuencia de un gen que codifica nucleótidos para aminoácidos de una proteína.

factor de transcripción: proteína que regula la transcripción de un gen.

fenotipo: manifestación en los caracteres de un individuo (o célula) de su expresión genética.

gen: unidad funcional del ADN que contiene la información necesaria para dar lugar a una proteína.

gen supresor de tumores: gen cuya activación desregula la división celular produciendo un fenotipo maligno. Conocido también como antioncogén.

genoma: el conjunto de todo el ADN contenido en los cromosomas.

hibridación: unión de ácidos nucleicos o nucleótidos complementarios.

hibridación *in situ*: unión de una sonda al ADN en el propio tejido o célula.

histonas: familia de proteínas que empaquetan el ADN en los cromosomas.

intrón: secuencia de nucleótidos de un gen que no codifica para aminoácidos.

mapa de restricción: conjunto de bandas ADN características para una especie o individuo después de haber tratado su ADN genómico con enzimas de restricción.

Northern blot: técnica de hibridación de sondas de ARN, separadas por tamaño e inmovilizadas en membranas de nitrocelulosa-nailon.

nucleosomas: estructura en forma de cuenta de collar formada por la unión del ADN con las histonas.

oncogén: gen cuya activación desregula la división celular produciendo un fenotipo maligno.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

plásmido: anillo de ADN con capacidad autorrepliativa que se encuentra en el interior de bacterias.

polirribosomas: asociación de ribosomas.

primer: pequeña secuencia de ADN complementaria a la zona de inicio de transcripción necesaria para la polimerización del ADN.

quimera: molécula de ADN recombinante de dos o más especies distintas.

replicación: duplicación de una molécula de ADN mediante la acción de ADN polimerasas.

ribosoma: estructura situada en el citoplasma celular en la que tiene lugar la síntesis de proteínas.

secuenciación: técnica que permite la lectura lineal de los nucleótidos de un ácido nucleico.

sonda: fragmento de ADN o ARN utilizado para detectar y cuantificar ADN genómico o ARNm.

Southern blot: técnica de hibridación de sondas a ADN separado por tamaño e inmovilizado en una membrana de nitrocelulosa-nailon.

***splicing*:** proceso por el cual regiones no codificadas del ARN primario son eliminadas para formar el ARNm. Se denomina *alternative splicing* cuando este proceso origina distintas proteínas a partir de un mismo mensajero.

traducción: proceso por el cual la información genética contenida en el ARNm es utilizada para sintetizar proteínas.

transcripción: proceso por el cual la información genética contenida al ADN es utilizada para sintetizar ARN.

transcriptasa inversa: enzima de origen retroviral que cataliza la formación de ADN a partir de un ARN homólogo.

tripletes: tres nucleótidos consecutivos que codifican para un aminoácido o una señal funcional. Similar a codón.

Western blot: técnica de detección y cuantificación de una proteína específica separada por tamaño e inmovilizada en membrana de nitrocelulosa-nailon.

BIBLIOGRAFÍA

1. Starnbach MN, Falkow S, Tompkins LS. Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1.257-1.261.
2. Bej AK, Mahubani MH, Miller R, Di Cesare JL, Haff L, Atlas RM. Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. *Mol Cell Probes* 1990; 4: 353-365.
3. Walker DA, Taylor I, Mitchell DM, Shaw RJ. Comparison of polymerase chain reaction (PCR) amplification of 2 mycobacterial DNA sequences, IS6110 and the 65kD antigen gen, in the diagnosis of tuberculosis. *Thorax* 1992; 47: 690-694.
4. Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet* 1990; 336: 451-453.
5. Hata D, Kuze F, Mochizuki Y. Evaluation of DNA probe test for rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *J Pediatr* 1990; 116: 273-276.
6. Einsele H, Vallbracht A, Jahn G, Kandolf R, Muller CA. Hybridization techniques provide improved sensitivity for HCMV detection and allow quantitation of the virus in clinical samples. *J Virol Methods* 1989; 26: 91-104.
7. Van Ketel RJ, De Wever B. Genetic typing in a cluster of *Legionella pneumophila* infections. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1.105-1.107.
8. Olive DM. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 261-265.
9. Kato N, Ou CY, Kato H. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 33-37.
10. Lampel KA, Jagow JA, Tracksess M, Hill WE. Polymerase chain reaction for detection of invasive *Shigella flexneri* in food. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 1.536-1.540.
11. Yokota J, Akiyama T, Fung Y-KT. Altered expression of the retinoblastoma (RB) gene in small-cell carcinoma of the lung. *Oncogene* 1988; 3: 471-475.
12. Hensel CH, Hsieh CL, Gazdar AF. Altered structure and expression of the human retinoblastoma susceptibility gene in small cell lung cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 3.067-3.072.
13. Takahashi T, Nau MM, Chiba I. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989; 246: 491-494.
14. Chiba I, Takahashi T, Nau MM. Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1990; 5: 1.603-1.610.
15. Baker SJ, Markowitz S, Fearson ER, Wilson JKV, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 1990; 249: 912-915.
16. Vostrejs M, Moran PL, Seligman PA. Transferrin synthesis by small cell lung cancer cells acts as an autocrine regulator of cellular proliferation. *J Clin Invest* 1988; 82: 331-339.
17. Nakanishi Y, Mulshine JL, Kasprzyk PG. Insulin-like growth factor-I can mediate autocrine proliferation of human small cell lung cancer cell lines *in vitro*. *J Clin Invest* 1988; 82: 354-359.
18. Natale RB, Cuttita F, Nakanishi Y, Minna J, Gazdar A, Mulshine J. IGF-I can stimulate proliferation on non-small cell lung cancer cell lines *in vitro*. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1988; 7: 197.
19. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor κ B. A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1.066-1.071.
20. Barnes PJ, Adcock I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14: 436-441.
21. Saatioglu F, Claret FX, Karin M. Negative transcriptional regulation by nuclear receptors. *Semin Cancer Biol* 1994; 5: 347-359.
22. Yang-Yeng HF, Chambard JC, Sun YL. Transcriptional interference between c-jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 1990; 62: 1.205-1.215.
23. Ray A, Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 752-756.
24. Adcock MI, Shirasaki H, Gelder CM, Peters MJ, Brown CR, Barnes PJ. The effects of glucocorticoids on phorbol ester and cytokine stimulated transcription factor activation in human lung. *Life Sci* 1994; 55: 1.147-1.153.
25. Scheinman IR, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin AS Jr. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF- κ B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 943-953.
26. Scheinman IR, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS Jr. Role of transcriptional activation of I- κ B in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995; 270: 283-286.
27. Rich DP, Anderson MP, Gregory JR. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* 1990; 347: 358-363.
28. Drumm ML, Pope HA, Cliff WH. Correction of the cystic fibrosis defect *in vitro* by retro-virus mediated gene transfer. *Cell* 1990; 62: 1.227-1.233.
29. Rosenfeld MA, Yoshimura K, Trapnell BC. *In vivo* transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell* 1992; 68: 143-155.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL RECOMENDADA

- Barnes PJ, Stockley RA. Molecular biology of lung disease. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994.
- Watson JD, Tooze J, Kurtz DT. Recombinant DNA. A short course. Nueva York, Scientific American Books, 1983.
- Davis LG, Dibner MD, Battery JF. Basic methods in molecular biology. Nueva York; Elsevier Science, 1986.
- Brown TA. Molecular biology LabFax. Oxford: Bios Scientific Publishers, Academic Press, 1991.
- Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steiz JA, Weiner AM. Molecular biology of the gene. California: The Benjamin/Cummings Publishing, Menlo Park, 1987.
- Micklos DA, Freyer GA. DNA science. A first course in recombinant DNA technology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1990.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989.