

Avances y perspectivas de la medicina molecular

I. Introducción

Salvador Said-Fernández*

Recepción 14 de abril del 2000; aceptación 19 de junio del 2000

Tengo el honor de compartir este foro con la doctora en Microbiología: Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez, el doctor en Inmunología: Mario César Salinas Carmona y el doctor en Genética y Biología Molecular: Hugo Barrera Saldaña. Todos ellos son profesores de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, pertenecen al Sistema Nacional de Investigadores y son miembros muy distinguidos de la comunidad científica de nuestro país. La doctora Herminia Martínez Rodríguez es nuestra invitada especial y los doctores Mario César Salinas y Hugo Barrera pertenecen a la Academia Nacional de Medicina formando parte del Departamento de Biotecnología Médica.

Desde que la humanidad tiene memoria, el hombre ha tomado ventaja de la mayor parte de los conocimientos disponibles. En el último siglo esta situación se ha hecho mucho más notable. Destacan por ejemplo, los equipos con que se aplican los nuevos descubrimientos de la Física, como es el caso de los múltiples usos del laser o de las nuevas técnicas para imagen diagnóstica (ultrasonido, resonancia magnética nuclear, fluoroscopia, tomografía de emisión de positrones), o la cirugía laparoscópica, donde se usa una gama de dispositivos de alta tecnología. Por ejemplo las fibras ópticas para transmitir imágenes desde regiones del organismo antes inaccesibles.

Por supuesto que ninguna de estas técnicas habría sido posible sin el asombroso desarrollo de la informática. En nuestros días no podemos concebir

el ejercicio de la medicina sin la ayuda de las computadoras, los cuales forman parte integral de las principales herramientas de trabajo de los médicos.

Pero es de todos conocido que el armamentario electromédico no es lo único que está actualmente al servicio de la salud del hombre moderno, la Química ha contribuido en forma extraordinaria para desarrollar nuevos medicamentos y materiales para infinidad de usos. Vale la pena mencionar a las nuevas prótesis, resistentes funcionales y seguras que sustituyen partes anatómicas hasta hace poco imposibles de imitar, como los discos intervertebrales y la cadera. Los cirujanos implantan lentes intraoculares, usan metales inteligentes, que adoptan una forma transitoria, a baja temperatura para ser colocados durante el acto quirúrgico y otra definitiva a la temperatura corporal para desempeñar su función, una vez instaladas en sitio correcto. Ejemplos de estos metales son las guías para mantener la luz de las arterias después de una embolia y las grapas para reducir fracturas. Merece una mención especial la piel artificial, que no solo protege la zona lesionada, sino que estimula el crecimiento de la piel natural sin dejar cicatrices.

La Biología Celular, la Biología Molecular y la Inmunología son pilares de una nueva, poderosa y promisoriosa rama de la Medicina: la Medicina Molecular.

La terapia génica permite aislar, cultivar y manipular genéticamente prácticamente cualquier estirpe celular de cualquier especie, junto con sofisticadas técnicas para manipular el material

* División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social. Administración de Correos No. 4, Apartado Postal 20, Cl. Independencia, Monterrey, N.L. C.P. 64720. México.

Tel y Fax (018) 1-90-40-35, E, mail salvadorsaid@netscape.net

genético nos permite ahora introducir nuevos genes que expresen funciones deseables o eliminar las no deseadas.

En el campo de la Biología Celular, se ha logrado desarrollar técnicas especiales de cultivo y estimulación de las células totipotenciales, que tienen la capacidad de regenerar tejidos, incluyendo porciones importantes de la falange distal en los dedos de personas adultas. Es posible ahora implantar células beta de cerdo en el hombre, encapsuladas en materiales semipermeables para protegerlas del rechazo del sistema inmune. Desde ahí producen y excretan insulina en pacientes con diabetes tipo I.

Mediante Ingeniería genética se producen numerosas proteínas recombinantes de interés médico, como insulina, la vacuna contra la hepatitis B y diversas enzimas, utilizando como reactores biológicos células completamente extrañas al organismo humano, como las células de insecto o levaduras. También empieza a vislumbrarse la posibilidad de obtener órganos completos *in vitro* o completar la gestación en etapas cada vez más tempranas del desarrollo embrionario; y, por supuesto la clonación de organismos, incluyendo el humano, a partir de células diferenciadas obtenidas de individuos adultos.

Se conoce cada día más al sistema inmune y sus relaciones con virus, hongos, bacterias y protozoarios o metazoarios parásitos. Es posible identificar a los antígenos inductores de inmunidad protectora o enfermedades autoinmunes hasta el más fino detalle. Es decir, podemos ahora conocer el o los dominios de una proteína que son responsables de estimular al sistema inmune y saber si ésta induce preferentemente una respuesta celular o humoral. Es posible conocer la secuencia de este dominio y reproducirla masivamente con la ayuda de vehículos moleculares.

En ciertos casos se obtiene protección inmunológica utilizando como vacuna el DNA desnudo. Muchas vacunas se diseñan para ser expresadas por vehículos vivos, como bacterias o virus atenuados, que dentro del organismo, producen y liberan los antígenos de interés. Pueden sintetizarse antígenos completamente diferentes a los existentes en la naturaleza, formados con proteínas o porciones de las proteínas de los agentes patógenos e incluso con otras proteínas no relacionadas con la especie contra la que se desea producir una vacuna. Todas estas estrategias se están utilizan-

do para desarrollar la vacuna contra el SIDA y otras enfermedades.

Aplicando técnicas de ingeniería genética se están utilizando vegetales comestibles como vehículos de antígenos inductores de protección inmunológica contra enfermedades humanas. Con este enfoque ya se desarrolló y probó con resultados esperanzadores una vacuna expresada por papas para proteger contra la enteritis causada por el virus Norwalk. Sólo que las papas deben consumirse crudas. Todos sabemos que así no son agradables. Por ello está por desarrollarse otra vacuna que será expresada en plátanos, los cuales en los trópicos son accesibles a personas de todas las clases sociales y que son consumidos con gusto por los niños.

La Biología Celular, la Biología Molecular y la Inmunología han permitido un espectacular avance en los métodos de diagnóstico, tanto de enfermedades infecciosas y parasitarias como de las no infecciosas, entre las que se incluyen las enfermedades metabólicas, autoinmunes y genéticas.

Hasta hace muy poco tiempo, la perspectiva de muchos enfermos que padecían alguna de las enfermedades que acabo de mencionar era sólo la muerte. Con el advenimiento y desarrollo de la terapia génica este oscuro panorama empieza a cambiar rápidamente, es posible ahora modificar la estructura genética de células especializadas en forma dirigida para reinstaurar funciones enzimáticas u hormonales perdidas. Tal es el caso de la deficiencia de adenosindesaminasa, que produce una inmunodeficiencia severa y la fibrosis quística.

Otra amplia zona de oportunidad para la terapia génica es el tratamiento de cáncer. Por ejemplo, en el cáncer de mama y de próstata que está dando a los pacientes muchas esperanzas de curación.

Todo lo antes mencionado y mucho más es sólo el principio de un fantástico futuro de la Medicina.

Algunos investigadores han pronosticado que en un futuro no muy lejano la expectativa de vida del ser humano al nacer será de 140 años. Considerando el grado de desarrollo que tiene actualmente la medicina en general y la medicina molecular en particular y la velocidad con la que están avanzando, no podemos menos que pensar que quizás estos investigadores no están equivocados.

Abordaremos cuatro temas sobre áreas de la Medicina Molecular que están en pleno desarrollo: Diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias, diagnóstico molecular de enfermedades in-

fecciosas intracelulares, terapia génica en cáncer y desarrollo de vacunas contra enfermedades transmisibles.

Referencias

1. **Hademenos GJ.** Advances in stroke treatment. *Sci Med* 1999;6(3):8-17.
2. **Wine JJ.** Cystic fibrosis lung disease. *Sci Med* 1999;6(3):34-43.
3. **Fenlon HM.** Virtual colonoscopy. *Sci Med* 6;(5)1999:56-63.
4. **Douglas JT, Curiel DT.** Gene therapy factor IX deficiency. *Sci Med* 1999;6(3):2-3.
5. **Sunny Y, Wong Ken S, Ho Hugh S, Mason y Charles J.** Arntzen. *Edible Vaccines*.
6. **O'Biren SJ, Dean M.** In search of AIDS-Resistance Genes *Scientific American* 1997;277(3):28-35.
7. **Watson JC, Gilman M, Witkoski J, Zoller M.** Recombinant DNA. Second ed. New York. Scientific American Books. 1992.
8. *Nature Medicine. Vaccine supplement* 1998;5(4):474-500.
9. *Scientific American Special report New Victories against HIV* 1998;279(1).

IV. Terapia génica y su aplicación en cáncer de próstata

Hugo A Barrera-Saldaña,* Alfredo A Santillán,* Andrés Hernández-García,* Estuardo Aguilar-Córdoba,**
Augusto Rojas-Martínez*

Resumen

El cáncer de próstata es una de las neoplasias más frecuentes en el hombre. La búsqueda de tratamientos más eficaces y con menor morbilidad y menos mortalidad, justifica iniciar en nuestro país estudios clínicos de terapia génica como alternativa de tratamiento para esta malignidad. La terapia génica busca introducir un gen terapéutico en un tipo celular seleccionado, para reemplazar un gen defectuoso o para crear una propiedad metabólica nueva con un objetivo curativo. Existen diferentes estrategias de terapia génica antitumoral. Entre éstas se encuentran la terapia génica suicida, la inmunoterapia, la reversión fenotípica, la terapia de incremento de la resistencia a antineoplásicos y la terapia génica combinada/potenciadora. Un ejemplo de terapia génica suicida es el sistema HSV-tk/GCV, en el que el gen de la enzima timidin quinasa del virus Herpes simplex I introducido en las células tumorales, genera una enzima "foránea" que convierte a la pro-droga ganciclovir, en un compuesto que es tóxico para las células tumorales. Actualmente, este sistema está siendo investigado para tratar el cáncer de próstata en un protocolo clínico fase I-II en el HU de la UANL en Monterrey.

Palabras clave: Terapia genica, cáncer de próstata

Introducción

El cáncer de próstata es una de las neoplasias más frecuentes en el hombre. En México, este tumor tiene una tasa de mortalidad de 72.2/100,000 habitantes en edad post-productiva (>65 años), la cual la ubica como la primera causa de muerte por cáncer y la tercera causa general de muerte en el mismo grupo de edad en nuestro país.¹ El tratamiento estándar del cáncer prostático consiste en

Summary

Prostate cancer is one of the most frequent tumors in men. The search for more efficient treatments with less morbidity and mortality justifies the employment of gene therapy clinical trials in Mexico as an alternative treatment for this disease. The purpose of gene therapy is to introduce a therapeutic gene into a specific cell to substitute for a defective gene or to create a new metabolic property with a curative goal. There are different mechanisms of anti-tumor gene therapy suchs as suicide gene therapy, immunotherapy, phenotypic reversion, antineoplastic drug resistance, and enhanced gene therapy. An example of suicide gene therapy is the HSV-tk/GCV system, in which the Herpes simplex I thymidine kinase gene expressed in tumor cells generates a foreign enzyme that converts the pro-drug ganciclovir into a toxic compound. Currently, this system is under research to treat prostate cancer in a phase I-II clinical trial in the UANL Hospital at Monterrey, Mexico.

Key words: Gene therapy, prostate, cancer

cirugía o radioterapia dependiendo del estadio clínico y de la etapa histológica, sin embargo estos tratamientos no han sido capaces de disminuir el impacto de esta enfermedad en nuestra sociedad. La búsqueda de tratamientos alternativos más eficaces y con menor morbilidad y mortalidad en este tipo de pacientes, así como también los avances recientes a nivel mundial de la Terapia Génica, justifican la exploración de la terapia génica en contra de este tipo de cáncer en nuestro país.

* Departamento de Inmunología Facultad de Medicina, y Hospital Universitario José E. González. Universidad Autónoma de Nuevo León. Eduardo Aguirre-Pequeño y Francisco I. Madero # 325 Norte Colonia Mitras, Monterrey, N.L. CP 64460, Monterrey N.L.

** Gene Vector Laboratory. Department of Pediatrics, M.C. 3-2374, 1102 Bates, Suite 1170, Houston Texas, 77030.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Hugo A. Barrera Saldaña. Ave. Fco. Madero y Dr. E. Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey N.L., México. Teléfono: (8) 329-41-73 Fax: (8) 333-7747.

Fundamento de la Terapia Génica

En los últimos 25 años se han descubierto los genes responsables de muchas enfermedades y desde hace aproximadamente dos décadas se ha pensado en la posibilidad de tratar algunos desórdenes utilizando genes como agentes terapéuticos. Los protocolos de terapia génica buscan introducir un gen en un tipo celular seleccionado, para compensar la falta o mal funcionamiento de la versión endógena, o para crear una propiedad metabólica nueva con el objeto de curar la enfermedad. Estos genes “foráneos” pueden introducirse a las células o tejidos por medio de un vehículo o vector de terapia génica.

Muchas enfermedades presentan a menudo un componente molecular que podría ser blanco de una estrategia de corrección genética, como las enfermedades mendelianas, trastornos reumatológicos y algunas enfermedades infecciosas como el SIDA. Sin embargo, más de 70% de los ensayos clínicos que se están llevando a cabo actualmente se centran en el tratamiento del cáncer.

Selección del vector y del gen

Existen diferentes “modelos” de vectores de terapia génica, entre los cuales se encuentran los de tipo viral, como los retrovirus, adenovirus y virus adeno-asociados, y los no virales como los liposomas y el DNA “desnudo”. Cada uno de ellos tiene características especiales y ventajas o desventajas particulares (cuadro I). Por esta razón, se debe elegir el vehículo más adecuado para introducir el gen terapéutico según la enfermedad a tratar y el sistema a utilizar. Dentro de estos vectores, los más utilizados son los virales, ya que son muy eficientes para introducir genes terapéuticos dentro de los núcleos de las células. Los genes terapéuticos se seleccionan de la enorme lista de genes humanos y no humanos completamente caracterizados que se pueden introducir en un núcleo celular para corregir o modificar un proceso bioquímico particular que producirá un beneficio para el paciente, como la corrección de la producción de la enzima requerida en una ruta metabólica, la manipulación de elementos del sistema inmune que ocasionan una enfermedad reumatológica o la modulación de procesos endócrinos para corregir una función homeostática, etc. Una vez elegido el

gen terapéutico, éste es incorporado dentro del genoma del vector. Posteriormente este vector recombinante es replicado y producido a títulos altos dentro de líneas celulares permisivas creadas especialmente para ello.

Terapia génica con vectores adenovirales

Los adenovirus humanos del grupo C han sido ampliamente caracterizados y representan un grupo especialmente atractivo de vectores virales, con utilidad potencial en los proyectos de terapia génica². Esto se debe a que la infección por este tipo de virus provoca síntomas relativamente benignos sin llegar a provocar citotoxicidad y tienen un potencial oncogénico bajo; además, su manipulación *in vitro* es muy sencilla y se pueden producir títulos muy elevados del vector. Una ventaja adicional se deriva del hecho de que el ADN viral no se incorpora a los cromosomas de las células huésped, minimizándose de esta manera la posibilidad de mutagénesis por inserción o efectos potenciales sobre las células germinales². La cepa Ad5 perteneciente al grupo C, es la más frecuentemente utilizada en los protocolos de terapia génica.²

Tipos de terapias génicas para el cáncer

Existen diferentes estrategias de terapia génica para el cáncer. Entre éstas se encuentran la inmunoterapia, en la cual el gen terapéutico tiene la finalidad de incrementar la respuesta inmune en contra del tumor; la reversión fenotípica en donde se busca que la célula neoplásica revierta su fenotipo a célula normal; la terapia de incremento de la resistencia a antineoplásicos, la cual se administra a las células normales que pueden afectarse por este tipo de tratamientos y prepara al paciente para recibir dosis más agresivas del fármaco; la terapia génica aumentadora, en la que la terapia génica se combina simultáneamente con quimioterapia o radioterapia potenciando el efecto terapéutico y por último, la terapia génica suicida o de citotoxicidad condicionada, la cual representa la terapia génica más utilizada en cáncer. En esta categoría terapéutica, los genes introducidos en las células tumorales codifican para proteínas “foráneas” no humanas que

Cuadro I. Ventajas y desventajas de vectores de terapia génica

Vectores		Ventajas	Desventajas
Virales	Retrovirus	Alta eficiencia de transducción Integración y expresión prolongada Alto margen de tipos celulares Baja respuesta inmunológica	Transduce células en división activa Mutagénesis insercional
	Adenovirus	Alta eficiencia de transducción Integración y expresión prolongada Alto margen de tipos celulares Baja respuesta inmunológica	Transduce células en división activa Mutagénesis insercional
	Virus adeno-asociados	Alta eficiencia de transducción Alto margen de tipos celulares Altos títulos Transducción de células quiescentes o en transducción activa	Contaminación con adenovirus silvestre
	Lentivirus	Alta eficiencia de transducción Alto margen de tipos celulares Transducción de células quiescentes o en transducción activa	Bajos títulos Mutagénesis insercional
No virales	Liposomas	No mutagénesis ni oncogénesis Baja respuesta inmunológica	Baja eficiencia de transducción
	DNA "desnudo"	No mutagénesis ni oncogénesis Baja respuesta inmunológica	Baja eficiencia de transducción

convierten a un medicamento biológicamente inactivo (pro-droga), como el ganciclovir (GCV), en un compuesto que es tóxico para el tumor.

Terapia génica suicida con vector adenoviral y el sistema tk/GCV

El gen de la enzima timidin quinasa del virus Herpes simplex I (HSV-tk) se está utilizando en varios protocolos a nivel mundial para tratar el cáncer, ya que esta enzima en las células tumorales blanco es capaz de convertir al GCV (un análogo acíclico de las purinas) en GCV monofosfato, el cual es posteriormente trifosfatado por las quinasas celulares. Este compuesto final se incorpora a las cadenas nascentes del ADN durante la replicación tumoral y bloquea este proceso.³ Adicionalmente se ha reportado que este tratamiento es capaz de amplificar su capacidad citotóxica mediante el efecto de testigo,⁴ en el cual las células tumorales vecinas a las impactadas por el gen terapéutico también son aniquiladas, y por la activación de la respuesta celular inmune en contra del tumor; ambos verificados en modelos murinos de cáncer de próstata.⁵ De esta forma es razonable esperar una respuesta sistémica antitumoral que podría afectar a las me-

tástasis. El efecto de testigo se logra mediante la exportación del GCV trifosfatado a través de las uniones comunicantes (gap junctions, en inglés) entre las células transducidas y las que no fueron impactadas por el vector de terapia génica.⁶ Este mecanismo de amplificación del efecto citotóxico es crucial, debido a las limitaciones para introducir genes en la totalidad de la población tumoral. Los mecanismos de activación inmune celular antitumoral posteriores al tratamiento con el sistema HSV-tk/GCV, también afectan la progresión de procesos metastásicos en algunos modelos. Los riesgos de citotoxicidad para las células estromales o vecinas al tumor tratado son mínimos, pues los dos primeros mecanismos descritos afectan casi selectivamente a las células en división activa, como las células tumorales, teniendo un efecto casi nulo en las células quiescentes.

Terapia génica de cáncer de próstata en Monterrey

Actualmente se está llevando a cabo un protocolo de terapia génica para el cáncer de próstata fase I-II en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León en Monterrey, el cual tiene los objetivos de evaluar la toxicidad sistémica y la

eficacia antitumoral del sistema suicida HSV-tk/GCV en pacientes con cáncer de próstata intraglandular o extracapsular incipiente (estadios A, B y C₁) antes de ser sometidos a los tratamientos estándares consistentes en prostatectomía para los estadios A y B, y radioterapia focalizada para el estadio C₁. El esquema de terapia génica con el sistema HSV-tk/GCV ya ha sido estudiado en sujetos humanos con neoplasias, incluyendo este tipo de cáncer.⁷ Durante esta evaluación aproximadamente 30 pacientes serán inyectados intratumoralmente con el vector de terapia génica HSV-tk y recibirán la administración endovenosa de la prodroga GCV durante 14 días. Seis semanas después de la inyección del vector, se realizará prostatectomía total o radioterapia, según el estadio clínico del tumor al ingreso del estudio. En este estudio se vigilarán estrechamente los efectos tóxicos del esquema de terapia génica, mediante un cuidadoso seguimiento clínico y de laboratorio. Este monitoreo se realizará diariamente durante las primeras dos semanas de tratamiento y posteriormente, se realizará una evaluación periódica que pretende determinar la sobrevida de los pacientes. Adicionalmente, se analizará la eficacia terapéutica del procedimiento a través del seguimiento de los niveles séricos del antígeno prostático específico (APE) en aquellos pacientes que fueron sometidos a radioterapia. Después de la prostatectomía en los estadios A y B, el espécimen quirúrgico será sometido a análisis histopatológico y molecular para determinar los efectos de la inyección del vector, la distribución y la expresión del gen terapéutico HSV-tk, análisis que serán de gran trascendencia ya que hasta la fecha no hay estudio que describa estos efectos a nivel prostático en humanos. Adicionalmente, en el estudio propuesto se estudiará la emisión del vector viral en los fluidos corporales (sangre, orina y semen en los casos factibles), para analizar las posibles repercusiones ambientales del tratamiento por terapia génica.

Por el momento, las intervenciones propuestas son una adición al esquema estandarizado para el manejo del cáncer de próstata en el Hospital Universitario de la UANL. La implementación de este protocolo no intenta remplazar al tratamiento tradicional y no implica riesgos adicionales para los sujetos participantes. En caso de respuestas positivas al tratamiento, se proporcionaría un beneficio al paciente al disminuir la tasa de recurrencia y de metástasis en este tumor y se produciría un enorme impacto para el conocimiento médico, abriendo el camino para una nueva terapia que probablemente en un futuro se convierta en terapia estándar para el cáncer de próstata.

Referencias

1. Estadísticas vitales, grupo de edad: posproductiva. Capítulo mortalidad, 1998. SSA.
2. **Horwitz MS.** Adenovirae and their replication. In: Fundamental virology. Eds. Fields BN; New York, Raven Press, 1991:771-813.
3. **Moolten F.** Drug sensivity ("suicide") genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther* 1994;1:279-287.
4. **Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN.** The "bystander effect": Tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 1993; 53:5274-5283.
5. **Hall SJ, Sanford MA, Atkinson G, Chen SH.** Induction of potent antitumor natural killer cell activity by Herpes simplex virus-thymidine kinase and ganciclovir therapy in an orthotopic mouse model of prostate cancer. *Cancer Res* 1998;58:3221-3225.
6. **Carystinos GD, Katabi MM, Laird DW, Galipeau J, Chan H, Alaoui-Jamali MA, Batist G.** Cyclic-AMP induction of gap junctional intercellular communication increases bystander effect in suicide gene therapy. *Clin Cancer Res* 1999;5:61-8.
7. **Herman JR, Adler HL, Aguilar-Cordova E, Rojas-Martinez A, et al.** In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate: a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 1999;10:1239-1249.

III. Diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas por bacterias intracelulares

Mario César Salinas-Carmona*

Resumen

Las bacterias intracelulares que producen enfermedad en el hombre incluyen entre otras: Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium lepre, Nocardia brasiliensis, Nocardia asteroides sensu escrito, N. farcinica, N. nova etc. En general las enfermedades producidas por estos microorganismos son difíciles de diagnosticar por las siguientes razones: a) las manifestaciones clínicas que producen son vagas; b) el cultivo del tejido infectado con frecuencia obliga a procedimientos invasivos; c) usualmente estas bacterias son de crecimiento lento; y d) la taxonomía del género Nocardia aún es incompleta. El diagnóstico serológico de utilidad en la clínica se tiene solamente disponible para N. brasiliensis pero en todos los otros casos estos no es posible. Los avances de la Biología Molecular a través de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa permite detectar un número muy pequeño de bacterias en cultivos aislados de pacientes infectados. En este trabajo se describen las técnicas mas comunes que tienen utilidad clínica en el diagnóstico de algunas enfermedades por bacterias intracelulares.

Palabras clave: Biología molecular, infecciones bacterianas, diagnóstico

Summary

A partial list of intracellular pathogens producing human diseases includes Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium lepre, Nocardia brasiliensis, Nocardia asteroides sensu stricto, N. farcinica, N. nova, etc. Human diseases produced by these bacterial species are hard to diagnose. This is mainly due to the following facts: a) typical clinical symptoms are absent in most diseases produced by the above mentioned bacterial species; b) obtaining of biopsies to cultivate the causal agents frequently involves invasive procedures; c) in general, the above-mentioned microbial species grow slowly under in vitro conditions, and d) taxonomy of Nocardia genus is still incomplete. Serological diagnosis is only available for N. brasiliensis but not for the remaining intracellular bacterial species that have medical interest. Recent advances in molecular biology, in particular the arrival of the polymerase chain reaction (PCR), are very promising for improving clinical diagnoses of the above-mentioned diseases, considering the high sensitivity and specificity that these techniques possess. These new methods allow detecting a very small number of microorganisms isolated from clinical samples. In this paper, some techniques, that have potential utility for clinical identification of intracellular pathogenic agents, are described.

Key words: Molecular biology, bacterial infections, diagnosis

* Académico numerario.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Departamento de Inmunología Facultad de Medicina y Hospital Universitario José E. González. Universidad Autónoma de Nuevo León. Eduardo Aguirre-Pequeño y Francisco I. Madero # 325 Norte Colonia Mitras, Monterrey, N.L. CP 64460, Monterrey N.L. Teléfono y fax (8) 333-10-58 Correo electrónico msalinas@ccr.dsi.uanl.mx Proyecto apoyado parcialmente por CONACYT y PAICYT.

Las enfermedades infecciosas bacterianas en general pueden ser diagnosticadas por el cuadro clínico que se manifiesta en los pacientes y luego confirmarse mediante las técnicas microbiológicas clásicas diseñadas para la identificación del agente causal. Sin embargo, en algunas situaciones clínicas, el tiempo excesivo que esas técnicas requieren para obtener un diagnóstico es inaceptable. Por lo cual, durante el pasado siglo XX se desarrollaron técnicas inmunológicas basadas en la demostración de anticuerpos contra antígenos específicos de algunas bacterias, así se utilizaron las técnicas como la hemaglutinación, la fijación del complemento y más recientemente, (ELISA), para aumentar la sensibilidad de las pruebas que utilizan los ensayos inmunológicos enzimáticos en fase sólida. Esto ayudó indudablemente a disminuir el tiempo para identificar algunos agentes infecciosos pero no resolvió el problema completamente en el caso de las infecciones causadas por agentes bacterianos intracelulares.

En los últimos años del siglo XX fuimos testigos de los avances científicos y tecnológicos en el área de la Biología Molecular. Estos avances tecnológicos se están utilizando en el campo de la Medicina. El área de diagnóstico de enfermedades infecciosas no ha escapado a esta corriente innovadora y cada día vemos como las pruebas basadas en la tecnología de los ácidos nucleicos, por ejemplo la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) se usa con mas frecuencia. Esta técnica ha mostrado ya su utilidad clínica en la identificación de patógenos bacterianos como *Staphylococcus aureus*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Treponema pallidum*, etc.¹ Esta técnica de reacción en cadena de la polimerasa también ha sido utilizada con éxito en la identificación de parásitos como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum*, *Giardia lamblia*, etc. La

lista de agentes infecciosos en donde esta técnica de PCR ha sido utilizada en beneficio de los pacientes crece día con día. En este trabajo nos referiremos en especial al diagnóstico molecular de algunas enfermedades producidas por microorganismos bacterianos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardia asteroides* y *N. brasiliensis*, los cuales son ejemplo representativo de los microorganismos que se incluyen en el cuadro I.

Las técnicas de diagnóstico molecular, como la PCR que hemos mencionado en los párrafos previos, tienen una especificidad y sensibilidad superior a las técnicas microbiológicas clásicas, pero no resuelven todo el problema de diagnóstico, ni tampoco harán desaparecer a algunos de los métodos clásicos de la microbiología diagnóstica, al menos en el corto tiempo. En el caso de la tuberculosis pulmonar por ejemplo, las técnicas clásicas de diagnóstico han estado encaminadas fundamentalmente a la demostración del agente causal en una muestra biológica proveniente del enfermo con sospecha de infección, o en la demostración de la respuesta del huésped a través de la hipersensibilidad tardía en una prueba cutánea con el uso de una mezcla de antígenos como la tuberculina o el derivado proteico purificado (PPD)

En el caso de la tuberculosis pulmonar hasta hoy la prueba más simple que se ha utilizado para el diagnóstico ha sido la demostración por microscopía de luz de bacilos ácido-alcohol resistentes en la expectoración del paciente, hallazgo que luego se corrobora con el cultivo en medios microbiológicos. Desgraciadamente la búsqueda de bacilos por esta técnica tiene una sensibilidad baja; especialmente cuando en las muestras clínicas el número de bacterias es bajo. En casos como estos o para estudiar la relación epidemiológica entre enfermos y contactos, se utilizó la demostración de una secuen-

Cuadro I. Algunos microorganismos intracelulares patógenos para el hombre

Bacterias	Hongos	Parásitos
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Mycobacterium leprae</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Leishmania donovani</i>
<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>Nocardia asteroides</i>		
<i>Brucella melitensis</i>		

cia de inserción conocida como IS6110 en las bacterias aisladas, esto resultó de una gran utilidad médica, ya que esta secuencia de inserción es específica para todas las cepas del complejo *M. tuberculosis*.²

Las infecciones humanas por *N. asteroides* se han incrementado notablemente en personas con el sistema inmune comprometido; como es el caso de los enfermos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH1/2), o pacientes transplantados que reciben inmunosupresores. Aunque en el 40% de los casos de infecciones por *N. asteroides* no se encuentra un estado de compromiso inmunológico demostrable. Las infecciones que produce la *N. asteroides* son principalmente infección pulmonar o absceso cerebral; lo cual dificulta aun mas la toma de muestras clínicas para su cultivo. Pero aun cuando el cultivo es posible, tarda mas de dos semanas tener la confirmación del diagnóstico porque estos son gérmenes de crecimiento relativo lento. El diagnóstico rápido y preciso de las infecciones por *N. asteroides* es difícil. Las técnicas de biología molecular todavía tiene mucho que aportaren este campo.

Recientemente el uso de la tecnología de los ácidos nucleicos permitió separar el complejo *N. asteroides* en *N. farcinica*, *N. nova* y *N. asteroides sensu stricto*. Para ello Steingrube y colaboradores amplificaron un segmento de 439 pares de bases del gen que codifica para la proteína de choque térmico de 65-kDa y analizaron los patrones de digestión con diferentes endonucleasas.³ Esta información tiene importancia taxonómica; pero además utilidad clínica porque la susceptibilidad a los antibióticos de las diferentes cepas no es igual.⁴ Otra técnica de ácidos nucleicos conocida como Ribotipificación ha sido utilizada con éxito por Laurent y colaboradores, también para diferenciar especies bacterianas antes consideradas como complejo *N. asteroides*. En esta técnica se amplificó mediante la PCR: un fragmento del ADN que codifica para una secuencia parcial del ácido ribonucleico ribosomal 16S perteneciente a la especie de interés, si el ADN de la especie bacteriana aislada del paciente se hibrida con ADN ya caracterizado se tendrá una evidencia fuerte de que las bacterias aisladas de los pacientes pertenecen a la misma especie que el ADN utilizado como molde.⁵

En el caso de la infecciones por *N. brasiliensis*, en el departamento de Inmunología del Hospital Universitario José E. González se desarrolló una técnica inmunoenzimática para el diagnóstico serológico del actinomicetoma, basada en la respuesta de anticuerpos del huésped.⁶ El uso de la Biología Molecular en el caso de *N. brasiliensis* no está encaminada al diagnóstico, sino a la taxonomía. Gracias a ello Wallace y colaboradores pudieron proponer la existencia de una nueva especie conocida como *N. Pseudobrasiliensis*, que fue reconocida entre muestras clínicas aisladas de pacientes con lesiones invasivas.⁷

En mayo de 1999, nosotros publicamos una parte de la secuencia del gen que codifica para una proteína que se comporta como antígeno inmunodominante en los enfermos infectados con *N. brasiliensis*, y resultó ser una proteína con actividad de catalasa. En el mencionado artículo, las secuencias NB 10 y NB11 se buscaron en bacterias de géneros relacionados a *Nocardia* como *Gordona* y *Rhodococcus* y se sugirió su utilidad potencial en la diferenciación de especies.⁸

De todo lo anterior puede concluirse que las técnicas basadas en la demostración de secuencias de ácidos nucleicos específicas en bacterias patógenas para el hombre tendrán un uso importante en el corto plazo. En este caso están las enfermedades producidas por microorganismos intracelulares como *N. brasiliensis* que en ocasiones produce infecciones graves que ponen en riesgo la vida del enfermo y donde urge un diagnóstico rápido.⁹

Referencias

1. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. En Diagnostic molecular microbiology. Principles and Applications. Am. Soc. microbiology. Washington DC. 1993.
2. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH and Crawford JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Disease 1990;161:977-981.
3. Steingrube VA, Wilson RW, Brown BA, Jost KC Jr, Blacklock Z, Wallace RJ Jr. Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes including *Actinomyces*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. Clin. Microbiol. 1997;35:817-822.

4. **Steingrube VA, Wallace RJ Jr, Brown BA, Pang Y, Zeluff B, Steele LC, Zhang Y.** Acquired resistance of *Nocardia brasiliensis* to clavulanic acid related to a change in β -Lactamase following therapy with amoxicillin-clavulanic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991;35:524-528.
5. **Laurent F, Carlotti A, Boiron P, Villard J, Freney J.** Ribotyping: a tool for taxonomy and identification of the *Nocardia asteroides* complex species. *J. Clin. Microbiol* 1996;34:1079-1082.
6. **Salinas-Carmona MC, Welsh O, Casillas SM.** Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. *J. Clin. Microbiol.* 1993;31:2901-2906.
7. **Wallace RJ.Jr, Brown BA, Blacklock Z, Jost K, Brown JM, McNeil MM, Onyi G, Steingrube VA, Gibson J.** New *Nocardia* taxon among isolates of *Nocardia*. *J Clin. Microbiol.* 1995;33:1528-1533.
8. **Vera-Cabrera L, Johnson WM, Welsh-Lozano O, Salinas-Carmona MC.** Distribution of a *Nocardia brasiliensis* catalase gene fragment in members of the genera *Nocardia*, *Gordona* and *Rhodococcus*. *J Clin. Microbiol.* 1999;37:1971-1976.
9. **Salinas-Carmona MC, Castro A, Licón-Trillo A, Welsh O, Nagesh S, Eisenach KD, Rendón A.** Constrictive pericarditis and recurrent mycetoma due to *Nocardia brasiliensis* in non-immunocompromised patient. *J. Mycol. Med.* 1997;7:47-50.

II. Diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias

Herminia G. Martínez-Rodríguez,* Salvador L. Said-Fernández**

Resumen

Las enfermedades hereditarias constituyen una carga importante para la población humana. Anteriormente su diagnóstico se basaba en la detección de los productos génicos alterados a través de pruebas enzimáticas o de proteínas. Las técnicas de DNA recombinante han facilitado mucho su diagnóstico haciendo posible la detección de portadores y el diagnóstico prenatal o a edades tempranas. Por mucho tiempo el diagnóstico de enfermedades hereditarias era solo confirmatorio y no representaba alternativas de tratamiento para las personas enfermas, eso está cambiando al poder manipularse las condiciones ambientales que puedan modificar la gravedad de los síntomas o retrasarlos para que se presenten a una edad más tardía, en los individuos que se han identificado que están en riesgo genético, con lo que puede mejorarse sensiblemente la calidad de vida de los pacientes.

Palabras clave: *clave: Biología molecular, enfermedades hereditarias, diagnóstico*

Summary

Inherited diseases constitute an important burden to mankind. Prior to the development of diagnosis based on DNA analysis, inherited disease diagnosis was based on detection of abnormal gene products by protein or enzymatic analysis. DNA recombinant techniques have made the diagnosis of the above-mentioned diseases easier and have been allowed the detecting of carriers and performing prenatal diagnosis. For decades, diagnosis of inherited diseases was only confirmatory and did not allow physicians to offer any treatment choice. Fortunately this situation is now changing. At present, there exists the opportunity of manipulating the environment of individuals identified as genetically at risk, to achieve that symptoms be attenuated or postponed, thus increasing the quality of the life of the patients.

Key words: *Inherited diseases, molecular biology, diagnosis*

* Investigadora invitada. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Eduardo Aguirre Pequeño y Francisco I. Madero. Col. Mitras Centro CP 64460, Monterrey N.L.

** Académico numerario. Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste

Instituto Mexicano del Seguro Social, 2 de Abril y San Luis Potosí. Col. Independencia CP 64720. Monterrey N.L.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dra Herminia G. Martínez-Rodríguez Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León. Eduardo Aguirre Pequeño y Francisco I. Madero. Col. Mitras Centro. CP 64460

Introducción

Se consideran enfermedades hereditarias aquellas que tienen un origen genético y se transmiten de padres a hijos.

Aparte de los traumatismos, el término "no genético" puede ser un nombre mal empleado, porque es difícil concebir alguna enfermedad completamente como no genética.

Anteriormente, se pensaba que el mejor ejemplo de enfermedades que no tenían causas genéticas eran las enfermedades infecciosas ya que el agente causal era claramente exógeno al organismo enfermo. Este concepto está cambiando ya que se han logrado identificar genes que tienen mucho que ver con la resistencia o susceptibilidad de un huésped a un agente infeccioso.¹

Aunque muchas enfermedades genéticas son raras, la carga total de estas enfermedades en la población humana no es despreciable. Las alteraciones en genes únicos afectan del 0.5 al 1% de la población general y las alteraciones cromosómicas cuentan para casi la misma frecuencia de la enfermedad. Si a esto le adicionamos que muchos trastornos comunes que no son enteramente genéticos, tienen un componente de susceptibilidad genética importante como son: enfermedades cardíacas, diabetes, algunos de los cánceres más frecuentes y muchas enfermedades autoinmunes, el resultado es que los factores genéticos cuentan mucho más que el 5% del total de enfermedades que se presentan en las naciones desarrolladas. Es muy probable que este porcentaje se modifique cuando otras fuentes de morbilidad como contaminación ambiental o una dieta poco saludable, sean modificadas y/o controladas.²

Tipos de mutaciones más frecuentes y sus patrones de herencia

De acuerdo al número de genes dañados, las enfermedades hereditarias pueden ser: monogénicas o poligénicas. Las monogénicas se deben a alteraciones en un solo gen, tienen un patrón de herencia tipo mendeliano, se presentan con mayor frecuencia a edades tempranas (infancia y adolescencia), a la fecha hay descritas aproximadamente 4000 enfermedades de este tipo y para más de 600

de ellas, se han descrito mutaciones. Las poligénicas o multifactoriales tienen una interacción muy fuerte con factores ambientales, muestran un patrón de herencia no mendeliano, se presentan con mayor frecuencia a una edad madura y entre ellas están diabetes, enfermedad coronaria, hipertensión, algunas de las más importantes psicosis y muchas otras más.³

Las alteraciones génicas pueden deberse a mutaciones en punto, en las que hay alteración de un solo par de bases en el DNA, por ejemplo anemia de células falciformes y acondroplasia, o pueden deberse a delecciones o inserciones que pueden ser tan pequeñas como un par de bases o involucrar uno o varios exones o incluso todo el gen, ejemplos de ellas serían la neurofibromatosis, la distrofia muscular y la fibrosis quística. El fenotipo de enfermedad puede ser el resultado de pérdida o ganancia de función del producto génico.⁴

El análisis molecular de las enfermedades hereditarias

Antes de la tecnología del DNA recombinante, las enfermedades hereditarias se diagnosticaban detectando los productos afectados, por pruebas enzimáticas o de proteínas. Ahora, con las técnicas que se han desarrollado para el análisis molecular de las mutaciones, ni siquiera es necesario conocer el producto génico afectado. En principio todas las enfermedades genéticas pueden ser analizadas en términos moleculares y muchas de ellas podrán eventualmente ser tratables y/o curables a causa de descripciones moleculares precisas de los defectos subyacentes en el DNA y sus consecuencias metabólicas.²

Las técnicas de DNA dada su alta sensibilidad, tienen las siguientes ventajas: no se necesita hacer determinaciones de proteínas o enzimas ni cultivar células, no se requieren grandes cantidades de muestra, ni siquiera se requiere conocer el producto génico normal. Esto ha facilitado grandemente el diagnóstico prenatal, así como la detección de individuos portadores (es decir, que son sanos, pero portan un alelo mutado y por lo tanto pueden heredar la mutación a sus hijos). Estos son, sin duda, dos de los grandes beneficios que ha traído el diagnóstico molecular a la genética clínica.⁵

Se han desarrollado muchas técnicas para la detección de mutaciones, las que vamos a explicar a continuación, son solo algunos ejemplos de las que más se usan y es conveniente decir que para muchas enfermedades se usan varias de ellas. Algunas enfermedades se deben a un solo tipo de mutación y su detección es suficiente para hacer el diagnóstico. Sin embargo, muchas veces, puede haber mutaciones distribuidas a todo lo largo del gen, y pueden ser mutaciones puntuales, deleciones o inserciones, por lo que puede requerirse de la aplicación de varias de las técnicas aquí señaladas.

Prácticamente todas las técnicas requieren el aislamiento de DNA del paciente. Esto puede hacerse a partir de sangre o de una muestra de tejido, o de los amniocitos (células presentes en el líquido amniótico). Después de recuperar el DNA, éste puede digerirse con enzimas de restricción (endonucleasas que cortan el DNA en sitios específicos) y posteriormente analizar los fragmentos generados por electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida. En muchos casos el tamaño y/o el número de los fragmentos generados durante la digestión, puede poner de manifiesto la mutación de interés, pero en algunos otros, es necesario llevar a cabo hibridación de los fragmentos con una sonda que puede ser de DNA, RNA, o un oligonucleótido sintético, que reconozca específicamente a la secuencia de interés.

Dos técnicas que han resultado muy útiles en el diagnóstico de mutaciones son: Southern blot y Northern blot. Estas técnicas permiten la detección de fragmentos de DNA genómico o RNA mensajeros (RNAs) específicos en mezclas complejas. El Southern blot permite visualizar un solo fragmento específico en una mezcla que contenga millones de fragmentos. El tamaño del fragmento puede determinarse por su migración en el gel. Con Northern blot, una molécula específica de RNA mensajero puede detectarse en una mezcla de 10,000 o más RNA mensajeros derivados de una muestra de tejido. Con esta técnica, puede determinarse si el mensajero está presente en cantidades normales o alteradas y también si el tamaño corresponde a una molécula normal.

Ambas técnicas requieren el aislamiento del ácido nucleico (DNA o RNA), la separación de los fragmentos en gel, su transferencia a una membrana y su hibridación con una sonda ya sea con radioactividad o con métodos no isotópicos para detectar el fragmento.¹

Tanto el Southern como el Northern blot son pruebas muy valiosas pero tienen el inconveniente de requerir grandes cantidades de muestra y sondas marcadas. La reacción en cadena de la polimerasa, en cambio, permite que una muestra pequeña se amplifique hasta un millón de veces, por lo que la detección de la mutación, muchas veces no requiere de la utilización de radioactividad o de marcaje no isotópico y la cantidad de muestra que se requiere se reduce considerablemente.

Otra área de la tecnología de la genética molecular muy importante para la identificación de genes de enfermedades humanas, ha sido el análisis de secuencias comunes de DNA o polimorfismos. Estos permiten seguir a los genes en las familias en las que se presenta la enfermedad, lo cual de otra manera sería imposible. Las diferencias en secuencias destruyen o crean sitios de reconocimiento para enzimas de restricción y por consecuencia pueden ser detectados por Southern blot o PCR.

Para algunas enfermedades, como la distrofia muscular, las mutaciones descritas son muchas y están distribuidas a lo largo de todo el gen. La distrofia muscular se debe a una anomalía en el gen estructural de la distrofina; este gen está localizado en el cromosoma X, es muy grande (2 300 kb) y tiene 79 exones. Para detectar mutaciones en él, se han desarrollado ensayos de PCR múltiple en el que en un solo tubo se amplifican varios exones a la vez utilizando los juegos adecuados de oligonucleótidos.¹

Otra técnica que permite la detección de mutaciones, utiliza las sondas denominadas ASO (oligoalelo específicas). Estas son normalmente de 15-19 pb de largo y mediante experimentos de hibridación que se realizan en condiciones muy estrictas, se aparean específicamente solo con las secuencias perfectamente complementarias. Con un solo nucleótido que no sea complementario, no hay hibridación. Las sondas ASO están marcadas para su detección. Esta técnica requiere que se conozca perfectamente el sitio de la mutación así como de la inclusión de los controles adecuados para asegurar que solo hibridan con la mutación.

Aunque la secuenciación es la técnica que detecta los cambios de mutaciones de manera precisa, ésta técnica no se usa de rutina para el análisis de mutaciones porque es cara y todavía no se dispone de la tecnología que permita secuenciar rápidamente un gran número de muestras.⁶

Para los casos en que la mutación precisa se desconoce, se han desarrollado técnicas que permiten analizar grandes segmentos de genes para buscar posibles diferencias. Entre ellas está el análisis de heteroduplex (HA) y los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP).

En HA, las cadenas normales y las mutadas se desnaturalizan para que formen cadena sencilla y luego se corren en geles de gradiente desnaturalizante. Cuando una cadena normal se asocia con una mutante, se forma un heteroduplex que migra de manera diferente que las homoduplex.

Los SSCP se forman cuando cadenas sencillas normales y mutantes se separan por electroforesis no desnaturalizante, aquí se favorece que las cadenas sencillas se plieguen sobre si mismas formando una estructura tridimensional que es diferente, aunque haya solo una base de diferencia.⁶

Tradicionalmente, los genes humanos se han considerado entidades estables con secuencias idénticas que se transmiten a generaciones sucesivas. Las variaciones a esta regla son raras pero recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo que ha representado un reto para las creencias tradicionales. Se trata de las "mutaciones dinámicas" o repeticiones inestables de tripletes⁷. Entre las enfermedades que presentan estas mutaciones tenemos el síndrome de X frágil que es la forma más común de retraso mental heredado, la distrofia miotónica y la enfermedad de Huntington que es una enfermedad neurodegenerativa, progresiva que se presenta en 1 en 10,000 individuos. Se hereda de manera autosómica dominante con una penetrancia completa y edad de manifestación variable, con una media de 40 años. Estas mutaciones pueden ser diagnosticadas por la reacción de amplificación de la polimerasa y utilizando una sonda oligonucleotídica que hibride con los fragmentos amplificados.¹

Aunque muy brevemente, hemos revisado aquí algunas de las principales técnicas (obviamente no todas) empleadas para el diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias.

Beneficios y perspectivas con el diagnóstico molecular de las enfermedades hereditarias

Es pertinente comentar en este momento la importancia de que los genetistas clínicos conozcan cuando menos las generalidades de estas

técnicas, para no esperar de ellas más de lo que pueden dar, pero tampoco para que por desconocimiento de las mismas, no las empleen y se pierdan ellos mismos y sus pacientes, de las grandes ventajas que representan para la medicina moderna, el uso de estas técnicas para el diagnóstico de enfermedades.

Por mucho tiempo, el diagnóstico de enfermedades hereditarias fue solo confirmatorio y no representaba alternativas de tratamiento para las personas enfermas. Afortunadamente las cosas están cambiando y esto es muy notable para el asesoramiento genético en el diagnóstico prenatal y el de portadores.

Uno de los beneficios más importantes de la identificación de factores genéticos en la susceptibilidad a enfermedades, puede ser no el potencial de terapia génica, como pudiera pensarse, sino la oportunidad para el tratamiento y prevención de la enfermedad clínica manipulando el ambiente de individuos genéticamente en riesgo¹, lo cual puede retrasar la presentación de los síntomas o cuando menos moderarlos, para que el paciente tenga una mejor calidad de vida. Esto es particularmente aplicable a las enfermedades multifactoriales como las que se deben a repeticiones inestables de tripletes y a los síndromes de cáncer familiar⁸. Sin embargo también debe mencionarse la controversia que existe cuando la detección de una mutación se realiza en un individuo asintomático en el que la enfermedad detectada no puede ser tratada o prevenida o en los posibles casos en los que de saberse que un individuo es portador de una mutación pudiera ser causa de una discriminación social o laboral.⁹

Referencias

1. **Gelehrter TD, Collins FS, Ginsburg D.** Principles of medical genetics. 2da. ed. Ed William and Wilkins, 1998.
2. **McConkey EH,** Human genetics: the molecular revolution. Jones and Bartlett Publishers Inc. Boston, 1993.
3. **Oliva VR.** Genoma humano. Masson S.A. Barcelona, España, 1996.
4. **Speer MC.** Basic concepts in genetics in haines J.L., Pericak-Vanve M.A. Approaches to gene mapping in complex human diseases. John Wiley & Sons, Inc. New York 1998.
5. **Watson JD, Gilman M, Witkouski J, Zoller M.** Recombinant DNA. 2da Ed. Scientific American Books;1998.
6. **Coleman WB, Tsongalis GJ.** Molecular diagnosis for the clinical laboratorian. Humana Press. New Jersey, 1997.
7. **Sutherland GR, Richard RI.** Dynamic mutations on the move. J. Med Genet, 1993;30: 978-981.

8. **Murigia AR, Polli M, Martella C, Vinanzi G, Opocher G.** Molecular diagnosis of inherited diseases. Clinica et Chemical Acta, 1999; 280: 73-80.
9. **Motulsky AG.** If I had a gene test, what would have and who would I tell?. Lancet, 1999: 35-37 (suppl 1).

V. Diseño de vacunas contra enfermedades infecciosas.

Salvador Said-Fernández,* Francisco González-Salazar* Herminia G. Martínez-Rodríguez**

Resumen

Las vacunas son la forma más efectiva y económica de prevenir y controlar enfermedades infecciosas y parasitarias. A pesar del gran desarrollo que este tipo de biológicos ha experimentado en los últimos años, todavía hay enfermedades producidas por virus, como el SIDA y por protozoarios, como la amibiasis y la tripanosomiasis, que no han podido ser controladas mediante vacunas eficaces y seguras. La vacuna contra la malaria es una de las que mayor éxito ha tenido. Pero todas éstas aún están en pleno desarrollo. Existen numerosos factores que se oponen al éxito de las vacunas antes mencionadas. Algunos de ellos son el riesgo que se corre al utilizar virus vivos o DNA, en el caso del SIDA o de la capacidad que tienen los protozoarios para evadir, deprimir o inactivar la respuesta inmune protectora del huésped. Una vacuna efectiva debe inducir tanto la respuesta humoral como la respuesta celular del sistema inmune y considerar el ciclo biológico del agente causal. Se discuten aquí diversas y novedosas estrategias para desarrollar vacunas tanto contra SIDA como contra la amibiasis.

Palabras clave: Vacunas, infecciones, protozoarios

Summary

Vaccines are the most effective and reliable way to prevent and control infectious and parasitic diseases. In spite of the great development that this kind of biological products has reached over the past years, certain viral diseases, like AIDS and most of those produced by parasitic protozoa, like amebiasis and trypanosomiasis, still have not been controlled by means of safe and effective vaccines. Vaccine against malaria is one that has shown greater success. Accordingly, all are still being developed. Numerous factors oppose success. For example, one is the risk that includes the use of live viruses or their DNA, in the case of HIV or the ability that some protozoa have to depress, evade, or inactivate the protective immune response. An effective vaccine must induce both the humoral and the cellular branches of the immune system, and in addition to considering the entire biological cycle of the causative agent. In this contribution, several novel strategies to develop vaccines against amebiasis and AIDS are discussed.

Key words: Vaccines, parasitic diseases

Introducción

Una vacuna puede salvar más vidas y más dinero que cualquier otra intervención médica.¹

Hasta hace relativamente poco tiempo el concepto de vacuna se aplicaba exclusivamente a la prevención de enfermedades infecciosas y fue hasta hace poco más de 30 años que empezaron a aparecer resultados prometedores sobre el desarrollo de vacunas dirigidas contra enfermedades

causadas por parásitos, las cuales están aún en pleno desarrollo.

De acuerdo con Adrian J. Ivins¹ existen tres conceptos sobre las vacunas modernas que deben considerarse con especial atención para lograr los efectos benéficos deseados: (a) aspectos biológicos, (b) su costo/beneficio y (c) la cooperación internacional para aplicarlas en la mayor cantidad posible de personas en las áreas del mundo donde se les requiere.

* División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social. Administración de Correos No. 4, Apartado Postal 20, Col. Independencia, Monterrey, N.L. C.P. 64720. México.

** Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León. Ave. Eduardo Aguirre Pequeño y Ave. Madero, Colonia Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Salvador Said Fernández Centro de Investigación Biomédica del Noreste Ave. 2 de Abril y San Luis Potosí Col. Independencia Apdo Postal 020E 64 720 Tel y Fax (018) 1-90-40-35 E. mail: salvadorsaid@netscape.com

Nosotros dedicaremos esta contribución a un tema relacionado con las características biológicas de las vacunas: su diseño, desarrollo y resultados, sin pretender que ésta sea una revisión exhaustiva. Nuestro objetivo es sólo presentar algunos ejemplos sobre las estrategias más sobresalientes que se están abordando para desarrollar vacunas contra dos enfermedades importantes por su incidencia y mortalidad y que por las características biológicas de sus agentes causales ha sido extraordinariamente difícil desarrollar productos que protejan en forma segura, efectiva y duradera. Estas dos enfermedades son el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), uno de los retrovirus más complejos conocidos hasta ahora; y la Amibiasis, cuyo agente causal es el protozooario *Entamoeba histolytica*. El desarrollo de las vacunas contra el SIDA y enfermedades causadas por protozoarios está planteando a los investigadores difíciles y variados problemas, que como veremos aquí, han requerido de la mayor creatividad e ingenio y dedicación por parte de los investigadores, quienes han puesto a prueba los enfoques y tecnología más modernos y variados.

Vacunas contra el SIDA

Importancia epidemiológica del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida

El SIDA es una enfermedad extendida en todo el mundo y sus tasas de incidencia y mortalidad van en aumento. Durante 1997 se infectaron en el mundo 5.8 millones de personas con el virus del SIDA (VIH). Se estima que a principios de 1998 había en el mundo 30.6 millones de personas VIH-positivas. Más de 40% de estas personas eran mujeres y la mitad de ellas tenía una edad de 15 a 24 años.²

Características generales del VIH

El VIH es un retrovirus. Su genoma esta constituido por RNA, el cual se replica por medio de un DNA intermediario de doble cadena, dentro de la célula blanco. El virus está envuelto por una cubierta por la membrana plasmática de la célula blanco

que contiene glicoproteínas de cubierta (Gp 160 y Gp41), codificadas por el propio virus y que le sirven como medios de reconocimiento y anclaje a receptores específicos, en primera instancia a los macrófagos circulantes y después a los linfocitos CD4⁺. Gp 41 es responsable de la fusión de la membrana del virus con la de la célula blanco.² Dentro de la cubierta se encuentra el genoma con un tamaño de 9.2-kbp y la transcriptasa reversa, encargada de sintetizar la doble cadena de DNA, usando como templado el genoma original del virus, inmediatamente después de la infección.³ Desde el punto de vista inmunológico, el producto génico más importante es el de *env*, que codifica para las proteínas de cubierta Gp 120 y Gp 41.

Ciclo biológico de VIH-1

El virión VIH-1 rodeado de la glicoproteína de cubierta Gp 120 se une a dos co-receptores de superficie de los macrófagos circulantes: CD4 y CCR5.⁴ Las membranas celulares se fusionan, y el virus entra a la célula. Entonces se liberan el genoma y la transcriptasa reversa virales. La transcriptasa reversa sintetiza una copia de DNA de doble cadena, la cual entra al núcleo y se integra al DNA celular. En este estado el VIH se llama provirus. Después se sintetizan y ensamblan las proteínas de VIH dentro de las células infectadas y el virus adquiere una cubierta lipídica, la cual contiene numerosas copias de Gp120 y Gp41 y abandona la célula mediante un proceso de gemación.⁵

Vacunas contra el VIH⁶

El diseño de una vacuna capaz de proteger contra el SIDA sigue siendo un reto tan grande como cuando el virus estaba recién descubierto. Algunas de las razones más sobresalientes son las siguientes:

- (a) La respuesta inmune natural no destruye al VIH y se forman reservorios de éste, principalmente en el cerebro, en células de la microglia.
- (b) Ha sido necesario evitar el uso de virus completos vivos, atenuados o muertos, porque éstos representan un peligro potencial para las personas.

La proteína de cubierta Gp 120 puede mutar con el tiempo y unirse tanto a los co-receptores CD4 y CCR5 como a los timocitos portadores de CD4⁺ (T CD4), y de un cofactor llamado CXCR4 como a los cofactores CD4 y CCR5 de los macrófagos, como ocurre en la fase inicial de la enfermedad. En la fase tardía del SIDA la mayor parte de los virus pueden cambiar su afinidad exclusivamente por los correceptores de los linfocitos T CD4⁺ y convertirse en "T-trópicos". En este estado los virus destruyen a las células T infectadas, contribuyendo fuertemente al colapso del sistema inmune y al surgimiento de la fase clínica de la enfermedad⁴. Actualmente se conocen seis co-receptores más, además de CCR5 y CXCR4. En todos los casos el virus VIH se une a CD4 y a uno de los otros factores.²

Vacunas para estimular la respuesta humoral

Este tipo de vacunas ha probado su eficacia para combatir enfermedades como la poliomielitis, el sarampión y la influenza. En el caso del SIDA los diseños de vacunas más sobresalientes son los siguientes:

Proteínas de cubierta (Env). La mayor parte de este tipo de vacunas contienen proteínas de la cubierta viral o parte de éstas, porque siendo estas proteínas necesarias para la unión del virus con la célula blanco, al unírsele anticuerpos específicos neutralizan su función y el virus es incapaz de infectar. Estas vacunas, dirigidas contra Gp 160, o contra Gp 120 y Gp 41 (que se derivan de la primera) ya han sido probadas en voluntarios humanos y se ha observado que se generan anticuerpos capaces de neutralizar virus vivos, eliminando su habilidad para infectar macrófagos humanos *in vitro*. Sin embargo, estos anticuerpos sólo reconocen a las cepas de VIH que se usaron en las vacunas. Cuando se usaron cepas aisladas de pacientes estas vacunas fueron ineficaces. Entonces, las proteínas de cubierta puras parecen no ser los mejores candidatos para la vacuna.

Virus completos

Los virus completos, muertos, podrían presentar al sistema inmune una forma más natural de las proteínas de la cubierta, y por lo tanto estimular la

producción de anticuerpos más eficaces para neutralizar la capacidad de infectar del VIH. Sin embargo, este enfoque implica el peligro de inocular eventualmente virus activos o el material genético residual, que es potencialmente peligroso. Por lo tanto deberá tenerse un especial cuidado para inactivar a los virus; y por otro lado, un tratamiento demasiado estricto para inactivar a los virus podría hacer a la vacuna menos efectiva, porque podría desprender y eliminar a las proteínas de la cubierta. Este es un buen enfoque, aunque deberá resolverse el problema de la estabilidad de las proteínas de cubierta.

Pseudoviriones. Estas son estructuras artificiales parecidas a los virus. Son esferas lipídicas vacías que sólo portan a la Gp 160. Estas estructuras son muy seguras porque no tiene la capacidad de infectar ni de hacerse reproducir por las células blanco. Sin embargo no es fácil fabricar pseudoviriones estables, aunque hay muchas esperanzas para lograrlo en un corto plazo.

Vacunas para estimular la respuesta celular

Las células citotóxicas reconocen epitopos. Los cuales son fragmentos de los antígenos presentados a los linfocitos T CD8⁺ en la superficie de las células infectadas. Estos epitopos, en el momento de ser presentados, están ensamblados en los antígenos HLA, clase I. En este caso, no sólo los antígenos de superficie, sino también las proteínas internas pueden ser procesadas y presentadas a los linfocitos citotóxicos. En el caso de la vacuna contra el SIDA se deben seleccionar células específicas que sintetizan y expongan uno o más de los epitopos provenientes de las proteínas cuya síntesis es dirigida por el virus. De esta forma se podría inducir al sistema inmune a montar una respuesta contra todas las células infectadas que presenten en su superficie dichos epitopos.

Vacunas con vectores vivos. Esta modalidad de vacunas aprovecha la capacidad de ciertos virus (no VIH) para invadir células. La estrategia consiste en insertar genes del virus del VIH en estos virus, que no son patógenos para el hombre, permitiendo que estos agentes liberen dentro de las células los genes que codifican para los antígenos inductores de la respuesta inmune pro-

tectora. La célula entonces produce las proteínas virales, las reduce a epitopos y estos son presentados en su superficie para activar a los linfocitos T, los cuales se activarán y formarán células de memoria, los que estarán listos para combatir una infección por VIH. Uno de los virus más usados para esta estrategia es el virus de la viruela de los canarios, un virus relacionado con el virus de la viruela humana, el cual ha sido transformado con los genes del VIH que codifican para las proteínas de la cubierta y para proteínas internas, como Gag (la proteína del núcleo viral y la proteasa. Estas vacunas son seguras y despiertan una débil respuesta celular. La respuesta se ha mejorado haciendo producir a los virus vectores un mayor número de copias o una mayor variedad de proteínas del HIV dentro de las células infectadas por el virus vacunal.

Péptidos. Se ha intentado despertar la respuesta inmune celular inyectando péptidos, pero éstos pueden degradarse antes de llegar a su destino. La inducción de la respuesta inmune por este tipo de moléculas podría incrementarse usando mejores adyuvantes.

DNA desnudo. En primates y ratones la vacuna ha estimulado la respuesta de linfocitos T y en algunos experimentos ha protegido a los animales de la infección.

Estrategias combinadas. Las estrategias más efectivas son aquellas que estimulan tanto a la respuesta celular como a la humoral. Por ejemplo, un programa de vacunación de éstos podría iniciarse con un virus de la viruela de los canarios portando el gen que codifica para las proteínas de cubierta, para estimular la respuesta celular, y meses después el mismo paciente podría recibir la Gp120 pura, para estimular la respuesta humoral. Con la primera vacuna se prepara a las células para una infección y con la segunda se refuerza.

Ya se ha hecho las primeras pruebas en seres humanos con este enfoque, pero se usaron antígenos de virus preparados en el laboratorio y se obtuvo una respuesta débil.

VIH y VIS modificados mediante ingeniería génica

Muchos investigadores siguen pensando que el uso de virus del VIH vivo es la mejor forma de inducir una respuesta protectora. Para ello han estado

deletando sistemáticamente varios de los genes que este virus usa para replicarse. Un protocolo con médicos voluntarios se está llevando a cabo para probar esta vacuna.

Por otro lado se ha observado que el virus de la inmunodeficiencia de los primates, mal llamados simios (VIS) atenuados ha resultado seguro y demostrado su capacidad para inducir una respuesta protectora notablemente efectiva en estos animales. Sin embargo, en algunos casos estas vacunas han inducido síntomas de inmunodeficiencia, aún en animales no retados con el virus silvestre.

Vacunas contra amibiasis

La amibiasis es causada por *Entamoeba histolytica*. Se estima que afecta a 10% de la población mundial,⁷ pero es muy probable que estas cifras tengan que reconsiderarse en un futuro cercano debido a que *E. Dispar* (una especie no patógena) también parasita al intestino humano, y hasta hace poco tiempo no se le distinguía de la primera.⁸ Se estima que la amibiasis es causa 110 mil muertes al año.⁹

Las dos observaciones más generales acerca de que *E. histolytica* es capaz de despertar una respuesta inmune son: (a) que la frecuencia de reinfecciones por *E. histolytica* en pacientes recuperados de absceso hepático amibiano (AHA) es muy baja¹¹ y b) que los animales de laboratorio vacunados contra *E. histolytica* desarrollan una respuesta protectora contra abscesos hepáticos amibianos (AHA) o lesiones intestinales cuando se les inocular experimentalmente con amibas virulentas o disentería amibiana, lo cual discutiremos más adelante. Sin embargo el diseño de una vacuna confiable contra la amibiasis plantea una serie de dificultades, que deberán superarse para lograr el objetivo deseado.

Deben además tomarse en cuenta dos aspectos muy importantes de la biología de *E. histolytica*: su ciclo biológico y la capacidad que estos parásitos tienen para evadir la respuesta inmune.⁹

Es muy importante considerar el ciclo biológico completo del agente causal, como está sucediendo con el desarrollo de la vacuna contra la malaria¹¹ porque de esta manera se incrementa la posibilidad de identificar un mayor número de antígenos capa-

ces de despertar una respuesta inmune protectora y el número de oportunidades para interrumpir dicho ciclo. Los agentes causales de la malaria son varias especies de *Plasmodium*, cuyos ciclos biológicos¹² son mucho más complejos que el de *E. histolytica*. El ciclo biológico de *E. histolytica* consta solo de dos fases, una trófica, invasora y causante de la destrucción de tejidos (el trofozoíto) y otra infectiva, el quiste. El trofozoíto ha sido intensamente estudiado, pero la Biología Celular y Molecular de los quistes es prácticamente desconocida, fundamentalmente por la falta de un medio de enquistamiento masivo en condiciones axénicas para *E. histolytica*. Sin embargo se han hecho algunos avances en este sentido. En 1980 desarrollamos un medio eficiente, confiable y que además permite que las amibas inicien espontáneamente el enquistamiento en condiciones axénicas, pero con una pared débil.¹² Actualmente hemos desarrollado un nuevo medio donde las amibas forman una pared muy resistente, que contiene quitina y cuyas características morfológicas son prácticamente iguales a las de los quistes naturales. Pero en tanto no se obtenga un pleno éxito en los esfuerzos para producir quistes de *E. histolytica in vitro* todos los esfuerzos para desarrollar vacunas contra *E. histolytica* tendrán que seguirse concentrando en los antígenos de los trofozoítos.

Los trofozoítos de *E. histolytica* tienen una notable habilidad para evadir la respuesta inmune, inmovilizando,¹⁴ degradando anticuerpos anti-antígenos de superficie de las amibas¹⁵ y ejerciendo un efecto inmunosupresor. Esto último en los primeros estadios de la infección.⁹ Por lo tanto, las vacunas que se desarrollen tendrán que considerar todas estas características de las amibas para lograr una respuesta inmune eficiente.

Las vacunas contra la amibiasis están en pleno desarrollo y todavía lejos de estar en condiciones de usarse masivamente en beneficio de la humanidad.

Considerando que tanto la respuesta humoral como la celular del sistema inmune son importantes,⁹ es posible que la vacuna más efectiva contra la amibiasis tenga también que estimular a ambas ramas del sistema inmune.

Algunos de los trabajos que enseguida citamos presentan sólo los resultados iniciales, que refuerzan la idea de que es posible obtener una respuesta humoral, tanto en la luz intestinal, como en el torrente circulatorio y también una respuesta celular protectora. Algunos otros presentan ya los re-

sultados alentadores con vacunas experimentales en animales. A continuación presentamos algunos ejemplos de todos estos enfoques.

Inducción de la respuesta humoral utilizando trofozoítos completos usados como inmunógeno

Trofozoítos completos

Jain et al. Obtuvieron un cierto grado de protección en cobayos preinoculados con un número relativamente bajo de amibas vía intracecal y luego retados con un inóculo 80 a 100 veces mayor, también por vía intracecal o intramuscular.¹⁶ Otros autores observaron incrementos significativos en los títulos circulantes¹⁷ y coproanticuerpos¹⁸ anti-*E. histolytica* después de inocular animales de laboratorio con trofozoítos fijados con glutaldehído. La respuesta inmune humoral se incrementa notablemente cuando se utiliza la toxina del cólera como adyuvante¹⁸

Transferencia de pasiva de inmunidad mediada por células

Las células peritoneales de hámsteres inoculados vía intradérmica con amibas vivas son capaces de proteger contra la infección experimental a hámsteres no inmunizados.¹⁹

Protección con anticuerpos monoclonales

Un anticuerpo monoclonal dirigido contra un lipofosfoglicano de *E. histolytica* llamado EH5 fue capaz de proteger contra AHA a ratones inmunodeficientes.²⁰

Antígenos recombinantes

Uso de antígenos pre-diseñados

MBP/SRHEP-CTA2 (SRHEP-H) es un antígeno que contiene fragmentos de las siguientes 3 proteínas: SRHEP (*Serin rich Entamoeba histolytica protein*), MBP (*maltose binding protein*) y la

subunidad de la toxina del cólera CTA₂, conocida por su capacidad de incrementar la respuesta inmune hacia otros inmunógenos. Esta vacuna molecular indujo un incremento en la producción de IgA en mucosas y de IgG en suero cuando se administró por vía oral a ratones.

Vacunas anti *E. histolytica* construídas en vehículos moleculares vivos.

Antígenos recombinantes expresados en *Salmonella typhi* atenuada.

Se transformó con un plásmido portador de una secuencia de DNA que codifica para un segmento de GalNac a la cepa SL5928 de *Salmonella Dublin*. GalNac es una lectina localizada en la superficie de los trofozoítos de *E. histolytica* que se inhibe en presencia de galactosa/N-acetylglucosamina. Esta lectina juega un papel fundamental en la lisis por contacto que producen las amibas sobre sus células blanco. Cuando se inoculó por vía oral a un grupo de gerbos con estas bacterias se consiguió una disminución hasta de 90% en el tamaño de los abscesos hepáticos en comparación con los testigos no inmunizados.²²

Zhang T y Stanley Jr. inmunizaron ratones con salmonelas vacunales typhi (Δ cya, Δ crp, Δ asd), las cuales tenían inactivos los genes que codifican para la adenil ciclase (cya) y el receptor del AMP cíclico (crp). Esta cepa fue modificada mediante ingeniería genética para que sintetice SREHP/MBP. Los anticuerpos IgG anti-SREHP se incrementaron 10 veces en suero con respecto a los testigos no inmunizados.²³

Algunas contribuciones de nuestro grupo

Nosotros hemos dedicado nuestro principal esfuerzo a la identificación y purificación de factores de virulencia de *E. histolytica* y al enquistamiento de este protozooario en condiciones axénicas. Ya antes comentamos la importancia de un método para enquistar masivamente *E. histolytica in vitro*. Enseguida comentaremos algunos de los avances que hemos tenido para identificar, purificar y clonar estos factores, los cuales podrían servir para investigar si estas proteínas amibianas completas o algunos de sus epitopos son capaces de inducir una respuesta inmune humoral o celular en animales de laboratorio.

Hemolisinas

Se ha sugerido que la actividad citolítica de *E. histolytica* juega un papel determinante en la habilidad que estos parásitos tienen para destruir a las células blanco. Nosotros encontramos que la actividad hemolítica en extractos libres de células está relacionada con la virulencia de las cepas²⁴ Se han identificado varios factores citolíticos de *E. histolytica*, entre ellos una actividad dependiente del potencial de óxido-reducción²⁵ y fosfolipasas A.²⁶ También encontramos fosfolipasas A₁ y lisofosfolipasas en la misma fracción subcelular membranar de las amibas.²⁷ Las fosfolipasas A₁ son también citolíticas en algunas especies de protozoarios parásitos y las lisofosfolipasas inhiben la autodestrucción de las células destruyendo a los liso-derivados que las fosfolipasas A₁ y A₂ producen continuamente. Por estas características pensamos que estas tres enzimas son buenos candidatos para producir vacunas, induciendo la producción de anticuerpos contra estos factores de virulencia para inactivarlos y eventualmente despertar una respuesta celular contra las amibas portadoras de estos antígenos. Con esta idea en mente hemos purificado la principal fosfolipasa A₂ de *E. histolytica*, la cual es máxima a pH 8.4, y Ca²⁺ 1 mM²⁸ y clonamos una secuencia de cDNA que codifica para una citolisina dependiente de actividad de fosfolipasa A₂ (manuscrito en preparación). El siguiente paso será investigar si estas proteínas son capaces de inducir protección en animales de experimentación.

Por otro lado, investigaremos si los quistes que se forman espontáneamente en nuestro medio de cultivo (PEHPS) son capaces de inducir una respuesta inmune protectora contra amibiasis intestinal o absceso hepático amibiano en animales de experimentación.

Referencias

1. **Iverson AJ.** Why vaccines?. Nature Med 1998;4(Suppl. 5):474-476.
2. **Special report.** HIV Dynamics. Sci Med 1998;5(2):36-45.
3. **Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Chapter 25.** Marshaling Recombinant DNA to Fight AIDS. En: Recombinant DNA. Second edition.. New York: Scientific American Books 1998:485-509.

4. **O'Brien SJ, Dean M.** In Search of AIDS-Resistance Genes. *Scientific Am* 1997;277(3):28-35.
5. **Bartlett JG, Moore RD.** Improving HIV Therapy. *Scientific Am* 1998;279(1):64-73.
6. **Baltimore D, Heilman C.** HIV vaccines: Prospects and Challenges. *Scientific Am* 1998;279(1):78-83.
7. **Walsh JA.** Problems in recognition and diagnosis of amebiasis. Estimation of global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 1986;8:228-238.
8. **Clark CG, Diamond LS.** *Entamoeba histolytica*: An explanation for the reported conversion of nonpathogenic amebae to the pathogenic form *Exp Parasitol* 1993;77(4):456-460.
9. **Ortiz-Ortiz L.** 5. Amebiasis. En: *Parasitic infections and the Immune System*. Kierszenbaum F (Ed.). Academic Press Inc. San Diego, 1994, pp145-162.
10. **De León A.** Pronóstico tardío para el absceso hepático amibiano. *Arch. De Invest. Med* 1970;1(Supl.):205-206.
11. **Riley EM, Hviid L, Theander G.** 4. Malaria. En: *Parasitic infections and the Immune System*. Kierszenbaum F (Ed.). Academic Press Inc. San Diego, 1994, pp 119-143.
12. **Said-Fernández S, Mata-Cárdenas BD, González-Garza MT, Navarro-Marmolejo L, Rodríguez-Pérez E.** *Entamoeba histolytica* cysts with a defective wall formed under axenic conditions. *Parasitol. Res.* 1993;79:200-203.
13. **Campos-Góngora E, Viader-Salvadó JM, Martínez-Rodríguez HG, Zuñiga-Charles MA, Mora-Galindo J, González-Salazar F y Said-Fernández, S.** Mg, Mn and Co ions enhance the formation of *Entamoeba histolytica* cysts-like structures resistant to sodium-dodecyl sulfate. *Arch. Med. Res.* 2000 En prensa
14. **Calderón J, Muñoz M, Acosta HM.** Surface redistribution and release of antibody induced caps in entamebae *J Expt Med* 1980;111:s241-s244.
15. **Tran VQ, Herdman DS, Torian BE, Reed SL.** The natural Cysteine Proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and presents its binding. *J Infect Dis* 1998;508:511.
16. **Jain P, Sawhney S, Vinayak VK.** *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1980;74:347-349.
17. **Moreno-Fierros L, Domínguez-Robles MC, Enriquez-Rincón F.** The use of ELISPOT assay to evaluate intestinal and systemic antibody responses to locally administered *Entamoeba histolytica* antigen in mice. *Arch. Med. Res.* 1994;25:183-187.
18. **Navarro-García F, Pedroso M y López-Revilla R.** Cholera Toxin increases Rat Serum and Mucosal antibody responses Against *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Arch Med Res* 1997;28: S225-S227.
19. **Ghadirian E, Meerovitch E.** Passive transfer of immunity against hepatic amebiasis in the hamsters by cells. *Parasite Immunol* 1983;5:369-376.
20. **Marinets, A., Zhang T, Guillén N, Gounon P, Bohle B., Vollman U, Otto Scheiner, Wiedermann G., Stanley Jr. L and Duchene M.** Protection against invasive amebiasis by single monoclonal antibody directed against a lipophosphoglycan antigen localized on the surface of *Entamoeba histolytica*. *J Exptl Med* 1997;186:1557-1565.
21. **Sultan F, Jin L-L, Jobling MG, Holmes RK and Stanley Jr. SL.** Mucosal Immunogenicity of a holotoxin-like molecule containing the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) fused to the A₂ domain of cholera toxin. *Infect Immun* 1998;66:462-468.
22. **Mann BJ, Burkholder BV, Lockhart AL.** Protection in a gerbil model of amebiasis by oral immunization with *Salmonella* expressing the galactose/N-acetyl D-galactosamine inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica*. *Vaccine* 1997;15:659-663.
23. **Zhang T., Stanley Jr. SL.** Progress in an oral vaccine for amebiasis. Expression of the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) in the avirulent vaccine strain *Salmonella typhi* TY2 4297 (cya crp ansd):safety and immunogenicity in mice. *Arch Med Res* 1997;28:s269-s271.
24. **López-Revilla R, Said-Fernández S.** Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*: Hemolytic activity of trophozoite homogenates. *Am J Trop Med Hyg* 1980;29:209-212.
25. **Castro-Garza JE, Said-Fernández S.** Immediate cell membrane damage produced by *Entamoeba histolytica* subcellular extracts. *Arch Med Res* 1992;23:191-192.
26. **Said-Fernández S, López-Revilla R.** Free Fatty Acid Released from Phospholipids are the major heat-Stable Hemolytic Factor of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immu.* 1988;56:874-879.
27. **Vargas-Villarreal J, Martínez-Rodríguez H, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas BD, González-Garza MT, Said-Fernández S.** Identification of *Entamoeba histolytica* intracellular phospholipase A and Lysophospholipase L1 activities. *Parasitol Res* 1995;81:320-323.
28. **Vargas-Villarreal J, Olvera-Rodríguez A, Mata-Cárdenas BD, Martínez-Rodríguez HG, Said-Fernández S, Alagón-Cano A.** Isolation of an *Entamoeba histolytica* Intracellular Alkaline Phospholipase A₂. *Parasitol. Res.* 1998;84:310-314.