

Biología molecular en medicina: nuevas estrategias que originan nuevos desenlaces

Molecular biology at medicine: new strategies that leads to new outcomes

John Fredy Castro-Álvarez PhD¹, German Campuzano-Maya MD²

Resumen: El avance científico y tecnológico de la biología molecular en el mundo trajo un nuevo abordaje de los problemas biológicos, que ha permitido dar paso a una nueva etapa de la investigación científica en la biología, la química y la física, así como a nuevas prácticas en la medicina. El uso de las herramientas de la biología molecular como apoyo diagnóstico en un amplio número de enfermedades infecciosas y de base genética es uno de los campos que mayor desarrollo tiene actualmente en la medicina. Esta área de la práctica médica se circunscribe en el uso de la información genética (ADN y ARN) de los individuos para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad desde la patología molecular y la terapia génica, y actualmente, en el control y prevención de las mismas desde la identificación de factores de riesgo y el uso de esta información en la epidemiología molecular. Este módulo da inicio a una completa selección de temas de medicina y biología molecular que introducirán al lector en el qué, por qué y para qué de las herramientas de la biología molecular que se usan actualmente en los mejores laboratorios clínicos y de investigación en el mundo para la prevención, apoyo diagnóstico y terapéutica de un amplio número de enfermedades.

Palabras clave: Medicina molecular, biología molecular, diagnóstico clínico, ADN, ARN, proteínas, reacción en cadena de la polimerasa.

Abstract: Scientific and technological development of molecular biology in the world generated a new approach in the biological problems, which have opened a new era of scientific research in biology, chemistry, and physics, as well as to new procedures in medicine. The use of molecular biology tools in diagnosis of a wide range of infectious and genetic diseases is currently the base that supports the medical practice. This area of medicine is related with the genetic information use (DNA and RNA), of the subjects for diagnosis and treatment of the disease since molecular pathology and gene therapy, and the control and prevention of disease with the risk factors identification and the use of this information in the molecular epidemiology. This article is the beginning to a reviews series of molecular biology and medicine, that will introduce the reader in the what, why and how of the molecular biology tools currently used in clinical and research laboratories in the world for the prevention, diagnosis, and therapeutic support of a wide number of diseases.

Key words: Molecular medicine, molecular biology, clinical diagnosis, DNA, RNA, proteins, polymerase chain reaction.

Castro Álvarez JF, Campuzano Maya G. Biología molecular en medicina: nuevas estrategias que originan nuevos desenlaces. *Medicina & Laboratorio* 2014; 20: 11-42.

¹ Microbiólogo y Bioanalista, MSc en Biología, PhD en Biología. Grupo de investigación en Patología Clínica. Laboratorio Clínico Hematológico. Medellín, Colombia. Correo electrónico: idi@lch.co

² Médico especialista en Hematología y Patología Clínica. Docente Ad Honorem, Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. Coordinador Grupo de investigación en Patología Clínica. Médico Director, Laboratorio Clínico Hematológico. Medellín, Colombia.

Conflicto de intereses: los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Medicina & Laboratorio 2014; 20: 11-42.

Módulo 1 (La clínica y el laboratorio), número 102. Editora Médica Colombiana S.A., 2014[®]

Recibido el 30 de noviembre de 2013; aceptado el 30 de enero de 2014

La biología molecular, entendida hoy en día como el área de estudio de las moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) y de ácido ribonucleico (ARN), es un campo que vincula diferentes aproximaciones en el funcionamiento de cualquier organismo vivo. A nivel molecular, el ADN y el ARN están encargados de preservar y traducir a proteína la información necesaria para el funcionamiento celular, acompañado de los lípidos y carbohidratos, que en conjunto con las proteínas estructuran, mantienen y dinamizan el complejo molecular conocido como célula. En el nivel celular, los procesos de la génesis, la diferenciación, la división y la muerte, generados por la interacción coordinada de las moléculas tanto en el interior como en el exterior de la célula, permiten jerarquías de organización y separación funcional en los tejidos y los órganos que componen nuestro organismo. Por último, a nivel tisular, las moléculas y sus productos celulares generan de forma sinérgica un organismo como el ser humano que cuenta con más de 100 billones de células que interactúan constantemente de forma coordinada en sistemas como el nervioso, el muscular, el óseo, el digestivo, el respiratorio y el circulatorio, entre otros [1].

La biología molecular es la base estructural y funcional de cualquier organismo vivo, pero desde una mirada crítica al reduccionismo científico, no tiene la respuesta a todos los interrogantes acerca de la vida que se plantea el ser humano. El ADN y el ARN son una parte esencial de cualquier célula, pero a nivel celular, tisular y en el organismo vivo, sólo son actores de un sistema biológico que se encuentra en continua comunicación consigo mismo y con el medio que lo rodea. Los procesos patogénicos en el ser humano son la más clara evidencia del rol central del ADN y ARN en enfermedades de base genética como la fibrosis quística, la hemofilia, la enfermedad de Huntington y algunos tipos de cáncer de origen genético; pero a su vez, es posible encontrar una participación limitada en trastornos multifactoriales como la diabetes, la enfermedad cardíaca, la obesidad y la demencia, entre otras [2].

En este módulo de biología molecular se pretende hacer un recorrido conceptual de las bases científicas y tecnológicas que permitan hacer una aproximación del uso de esta disciplina en la medicina, describiendo los conceptos básicos más importantes para el área de la salud, que faciliten la comprensión del uso de las herramientas de la biología molecular en la práctica médica cotidiana y la utilidad clínica de las pruebas de laboratorio moleculares en la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de diversas enfermedades. Para conocer más a fondo los componentes que hacen parte de la relación entre la medicina y la biología molecular es necesario hacer un rápido recorrido por la historia y los conocimientos científicos acerca de la célula, los mecanismos que permiten el almacenamiento y transferencia de la información genética hasta culminar en la aplicación de este conocimiento en el ejercicio médico y el laboratorio clínico. Este primer artículo del módulo de biología molecular es el comienzo de una completa selección de temas de medicina y biología molecular que introducirán al lector en el qué, el por qué y el para qué de las herramientas de la biología molecular que se usan actualmente en los mejores laboratorios del mundo para la prevención, el apoyo diagnóstico y la terapéutica, entre otros.

De la estructura del ADN a la era de las ómicas

En la historia de la biología molecular se pueden encontrar tres momentos que han marcado el desarrollo científico y tecnológico de la biología y la medicina, y que han y seguirán dejando alguna una marca imborrable en la sociedad. El primero de ellos fue la descripción

de la estructura de la doble hebra de ADN que realizaron Watson y Crick en 1953 [3], descubrimiento que los catapultó a obtener el premio Nobel en 1962 por su aporte a la descripción de las bases bioquímicas que posibilitan la codificación de la información genética en las células. Este suceso poco valorado en su tiempo, abrió en la historia la posibilidad de descifrar los misterios más recónditos de la vida desde un código genético conformado por cuatro letras: A-T-G-C.

Todo nuevo abordaje conceptual genera nuevas preguntas, y con éstas, nuevas herramientas para resolverlas. Es así como en la década de los setenta, con la posibilidad de obtener e identificar fragmentos de material genético, se da otro salto conceptual en la historia de la ciencia y posiblemente de la humanidad, al poder manipular el material genético de cualquier organismo vivo con el desarrollo del ADN recombinante [4]. Este ADN es sintetizado en el laboratorio y puede ser introducido en cualquier célula u organismo vivo para eliminar (del inglés *knock-out*) o adicionar (del inglés *knock-in*) genes del código genético o genotipo original, y generar un cambio en la estructura o el comportamiento del organismo también conocido como fenotipo. Unido a este gran avance, en 1986, se desarrolló la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés *polymerase chain reaction*) que permite aislar un sólo fragmento específico de ADN y generar millones de copias hasta hacerlo visible o identificable a los ojos humanos [5]. En conjunto, estos tres desarrollos científicos y tecnológicos rodeados de diferentes descubrimientos y publicaciones en el área, estructuran la biología molecular que hoy en día abre un nuevo panorama a la medicina.

El segundo momento en la historia de la biología molecular se da en el auge de estos desarrollos, al concebir la posibilidad de leer el código genético, fragmento a fragmento, como un libro separado por 46 capítulos denominados cromosomas. La automatización de las herramientas de laboratorio y el acelerado avance de la biología molecular dan origen, en 1990, al Proyecto genoma humano, liderado por el científico norteamericano Francis Collins. Una alta inversión de capital, un equipo de científicos de diferentes países y el acceso a la tecnología de punta, genera un borrador inicial del genoma humano en el año 2000, con la publicación de los resultados en el 2001 [6] y la culminación del Proyecto en el 2003 [7]. Este gran logro sin precedentes en la historia de la humanidad está ligado a tantas preguntas como secuencias descritas; indagando desde la genómica, como se le conoció al estudio del genoma, muchos de las inquietudes que existían en la biología y la medicina.

Los aproximadamente treinta y ocho mil genes o secuencias con sentido biológico descritos en el Proyecto genoma humano, dan paso al tercer momento de la historia conocido como la era de las ómicas. En este punto es importante aclarar que los genes o secuencias con sentido biológico son descritos desde la utilidad o desde una explicación netamente teleológica, que asume que una secuencia específica de ADN produce una proteína en particular con una función definida. La genómica pretendía que conociendo la secuencia y el lugar en que se encontraba cada gen en el genoma completo, se podría descifrar su función, y dar explicación a grandes misterios del ser humano como las bases de la inteligencia y el origen de muchas enfermedades. A favor de la humanidad, los resultados del Proyecto genoma humano generaron una de las más grandes frustraciones, y a la vez, una de las más grandes conclusiones de la ciencia en la actualidad: el genoma humano es un componente de un

sistema complejo y dinámico que cambia e induce cambios constantemente al ambiente al que pertenece, el cual, al mismo tiempo, induce cambios sobre él, en un ciclo constante y dinámico de relaciones. El soporte de esta conclusión es evidente al identificar que un ratón y una planta (p. ej., *Arabidopsis* spp.), tienen la misma cantidad de genes que el ser humano, pero cada uno de ellos cuenta con desarrollos totalmente diferentes [6, 7].

Los interrogantes actuales que ha generado el Proyecto del genoma humano están encaminados a identificar, ya no sólo al ADN (genómica) como la base de la explicación de la vida, sino también al ARN (transcriptómica), las proteínas (proteómica), los carbohidratos (glicómica), los lípidos (lipidómica), los metabolitos (metabolómica), cómo estas moléculas interactúan entre sí (interactómica), entre otras muchas aproximaciones; y al uso de algunas herramientas computacionales como la bioinformática y la biología de sistemas, que permiten pensar en la modelación molecular de la célula y el tejido en tiempo real desde la Matemática (ver figura 1) [8]. Los desarrollos científicos y tecnológicos de la biología molecular, la genómica y actualmente el influjo de otras ómicas, han permeado constantemente la práctica médica [8-10]; poco a poco son muchas las aplicaciones que dan resultados tangibles desde el mejoramiento en el diagnóstico de las enfermedades, la identificación de factores de riesgo genético, la generación y la administración de medicamentos basadas en información molecular, el uso de la terapia génica para el tratamiento de algunas enfermedades, entre otros acercamientos que han dado un salto de inmensas proporciones y han permitido el ingreso de la biología molecular a la medicina y con ella a la vida cotidiana [11].

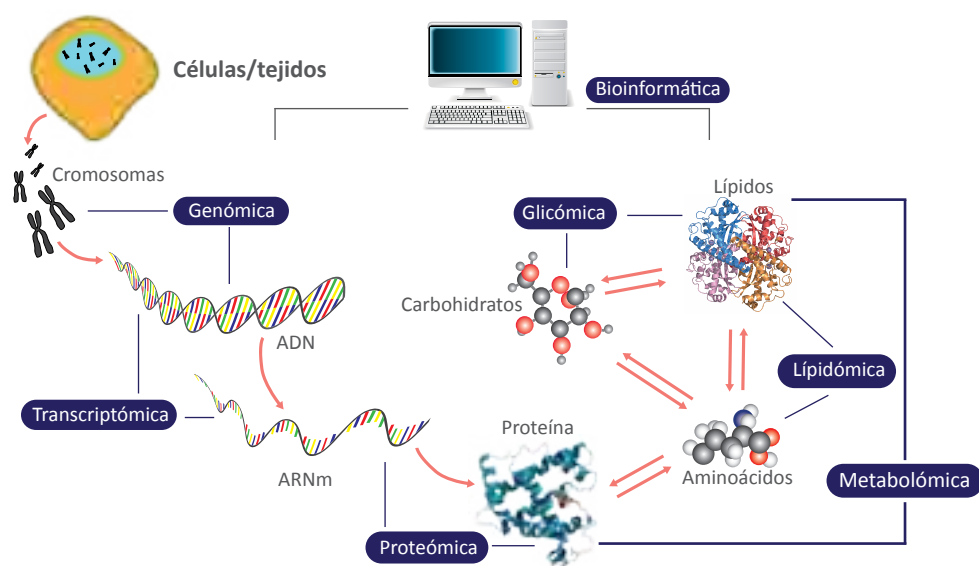


Figura 1. Contexto celular que cubre los tres momentos de la historia de la biología molecular. La hebra de ADN como unidad de almacenamiento de información en los cromosomas y la relación unívoca con el ARN para la producción de proteínas, que en conjunto con los carbohidratos y los lípidos mantienen la dinámica celular. A su vez, se muestra la interrelación que se genera entre el desarrollo de la genómica y el progreso de la era de las ómicas.

El genoma humano

Las células del cuerpo humano almacenan la información genética en 23 pares de cromosomas, a excepción del óvulo y el espermatozoide, que sólo tienen un juego de 23 cromosomas, y el eritrocito y la plaqueta, que en el proceso de diferenciación pierden su núcleo y por ende no tienen información genética en su interior. Los cromosomas contienen el ADN y están agrupados en el núcleo de la célula en conjunto con proteínas, ARN, lípidos, carbohidratos y compuestos orgánicos e inorgánicos que permiten la replicación del ADN en el proceso de formación de nuevas células [1]. Para la lectura del código genético y la producción de proteínas en la célula se da la transcripción (o paso de ADN a ARN) que permite la decodificación y organización de la información almacenada en el código genético que va ser traducida a proteínas; el ARN generado pasa al citoplasma donde el código es traducido, aminoácido por aminoácido, hasta formar una proteína por el mecanismo de traducción. Esta secuencia de eventos biológicos se conoce como el dogma central de la biología, el cual funcionó durante varias décadas como un patrón de respuesta unidireccional $\text{ADN} \rightarrow \text{ARN} \rightarrow \text{proteína}$ con un único sentido teleológico, que presentaba al ADN y el ARN como intermediarios para producir proteínas.

La publicación del genoma humano, en conjunto con otros trabajos, trajo consigo la caída del dogma central de la biología, al dar a conocer que sólo el 2 % del genoma humano contiene genes productores de proteínas y que el 98 % restante es “basura”, como explicarían algunos científicos, o tiene otras funciones, como se ha descrito actualmente [7, 9, 10]. Las modificaciones estructurales del ADN, las interacciones ADN-ADN, ADN-ARN, ADN-proteína, entre otras, han demostrado que el sentido unidireccional del dogma central $\text{ADN} \rightarrow \text{ARN} \rightarrow \text{proteína}$ se ha transformado en un esquema multidireccional de interacciones complejas, difícilmente entendibles con el esquema reduccionista y mecanicista que ha imperado en la concepción de la ciencia algunos siglos atrás (ver figura 2). El llamado actual que está realizando la biología molecular a la medicina, es la búsqueda de la complejidad intrínseca de los procesos patológicos para la comprensión, la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de los mismos [10].

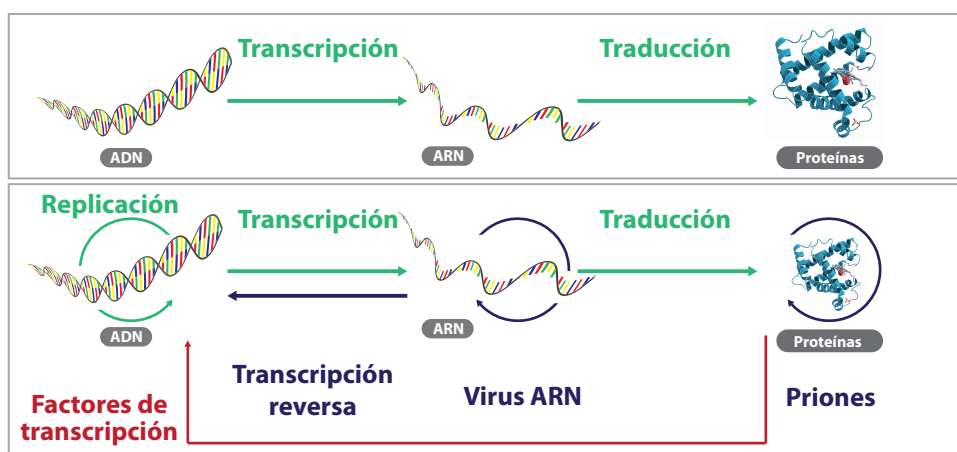


Figura 2. La relación del ADN, el ARN y las proteínas. **A.** Antiguo dogma central de la biología y **B.** algunos de los descubrimientos que han llevado a generar una visión dinámica y multidireccional del dogma central de la biología.

A continuación se realizará una revisión general de los mecanismos centrales que hacen parte de la codificación y decodificación del código genético, con miras a entender el principio de una de las herramientas moleculares más utilizadas actualmente en la medicina: la reacción en cadena de la polimerasa.

El ADN y la replicación

Después de 1953, el concepto de ADN tomó forma y fue representado como una doble hélice [3, 12]. Los nucleótidos, que son compuestos formados por un azúcar, una base nitrogenada y un grupo fosfato, unen la doble hélice por medio de apareamientos complementarios entre las bases nitrogenadas, y a su vez, cada hélice está anclada por los grupos fosfato de cada nucleótido, para conformar cadenas dobles de forma espiral de hasta 220 millones de nucleótidos unidos (ver figura 3). Las bases nitrogenadas que conforman los nucleótidos dan el nombre a cada una de las letras que generan el código genético: la A es la adenina, que se une a la T, denominada timina; así como la C, de citosina, se une a la G, conocida como guanina. Estas cuatro letras forman tripletas en la hebra de ADN, denominadas codones, las cuales representan un aminoácido en particular cuando se realiza la traducción del código genético a la proteína. En el genoma se conocen 64 codones que producen 20 aminoácidos, una señal de inicio para el paso de ARN a proteínas y tres señales de terminación del proceso [1].

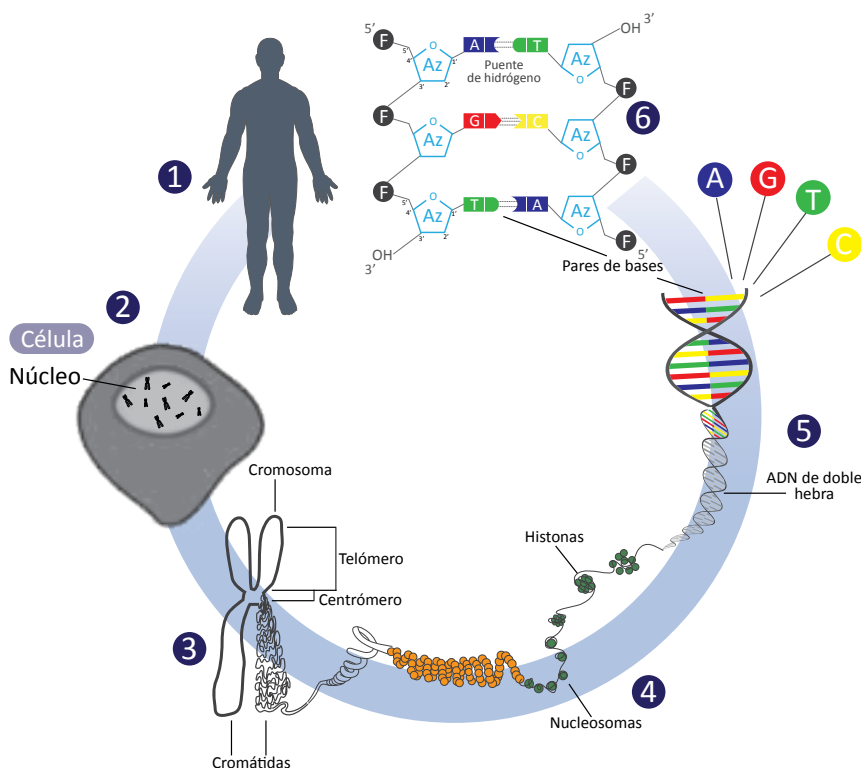


Figura 3. La biología molecular a escala. **1)** El ser humano como un sistema de órganos y tejidos interrelacionados, que de forma coordinada logra estructurar, coordinar, regular y preservar funciones básicas y de alta complejidad al mismo tiempo. **2)** La célula como unidad básica de autoregulación, que posibilita la interacción de proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos para generar una base funcional microscópica del ser humano. **3)** El ADN empaquetado en estructuras superenrolladas, que dan forma a 23 pares de cromosomas en constante dinámica e interacción con diferentes componentes de la célula

para un adecuado almacenamiento y transmisión de la información. 4) La interacción ADN y proteína, que limita y a la vez posibilita la producción de ARN y proteínas requeridas en un espacio y tiempo determinado de la célula. 5) y 6) La doble cadena de ADN en pares de bases complementarias conformada por un grupo fosfato (F), un azúcar (Az) y cuatro nucleótidos: adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G) del almacenamiento de la información genética en la célula.

En este punto es importante destacar que el cambio o mutación de un sólo nucleótido en el ADN puede variar o modificar una tripleta, lo que afecta la producción de una proteína específica y puede generar una alteración celular y tisular, que al no ser compensada o eliminada en la célula o tejido puede ser evidenciada en la práctica clínica como una enfermedad. Las mutaciones pueden ser espontáneas o inducidas, la primera de ellas se da de forma fortuita en los procesos de replicación del ADN o por cambios aleatorios de la secuencia, y la segunda es debido a agentes mutagénicos externos como la radiación, los virus y algunos agentes químicos. Aunque las mutaciones se pueden presentar durante la vida de cualquier ser humano, es necesario que se expresen en las células reproductoras para ser heredado y que no sólo se encuentre en el 2 % del ADN codificante, sino que también afecte un aminoácido en particular asociado con la función de una proteína. A pesar de la baja probabilidad de que suceda un cambio biológico que altere la función de una proteína, las mutaciones hacen parte de nuestra diversidad como seres vivos y es necesario escudriñar los mecanismos que la producen, siendo la replicación del ADN uno de los más importantes en la generación de mutaciones espontáneas [9, 10].

En términos generales, la replicación del ADN se inicia con la separación de la doble hélice para generar a partir de cada una de las hebras parentales (cadenas originales o hebras molde) dos hebras hijas complementarias (cadenas nuevas), lo que da origen a copias idénticas del material genético de doble cadena, formadas por una hebra parental y una hebra hija (ver figura 4). La secuencia de eventos se inicia con la participación de la enzima helicasa, que se encarga de separar las hebras parentales para que la enzima ADN polimerasa, a partir de una secuencia corta de nucleótidos, conocida como cebador (del inglés *primer*), que es complementaria a la hebra molde de sentido 3' → 5', sintetice una nueva hebra en dirección 5' → 3' (ver figura 4). El crecimiento de la nueva hebra se realiza por la unión del grupo hidroxilo (-OH) en el carbono 3' del azúcar, que está libre en el cebador, y el grupo fosfato (PO_4^{3-}) en el carbono 5' del azúcar del nucleótido que va a ser insertado, dejando libre nuevamente un grupo hidroxilo 3', al cual puede unirse un nuevo nucleótido. De ésta manera, el extremo de la cadena de ADN donde se encuentra el grupo hidroxilo 3' libre corresponde al extremo 3', y el lado opuesto, donde se encuentra el grupo 5' fosfato libre, el extremo 5' (ver figura 3, ítem 6) [13].

Debido al sentido antiparalelo del ADN, la replicación de la hebra molde complementaria debe realizarse en tiempos similares a la otra cadena, para asegurar que la copia sea fiel e igual en ambas hebras. Dado que el ADN se sintetiza extendiendo el extremo 3', sólo a partir de la hebra molde de sentido 3' → 5' se tendrá una síntesis continua de la nueva cadena, conocida como hebra líder o adelantada. Por su parte, a partir de la cadena molde complementaria de sentido 5' → 3', la ADN polimerasa realizará la síntesis de la nueva cadena, conocida como hebra rezagada o retrasada, en dirección 5' → 3', pero extendiendo el extremo 3' de manera discontinua y a partir de secuencias cortas del ADN molde, que darán como resultado pequeños fragmentos de ADN nuevo, denominados fragmentos de Okasaki, los cuales con la ayuda de la enzima ADN ligasa se unen y dan origen a una copia continua, completa e idéntica [13].

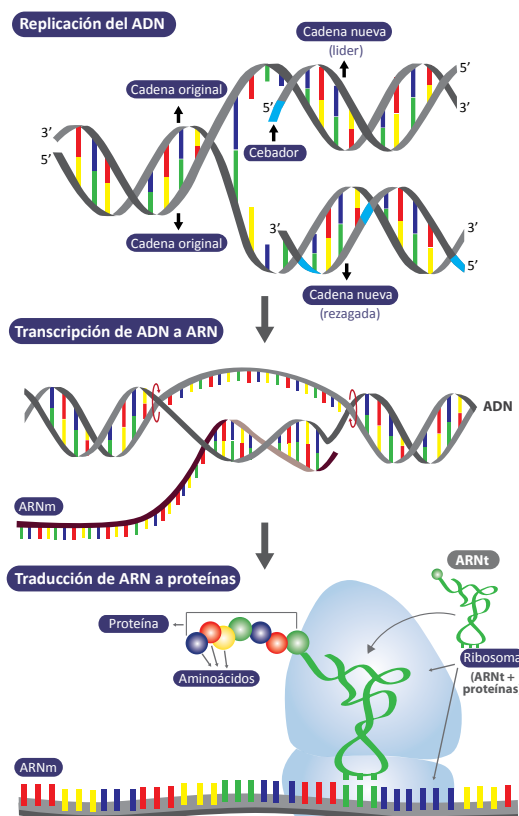


Figura 4. Representación esquemática del almacenamiento de la información genética en la célula. Mecanismos de replicación del ADN: a partir de una hebra doble de ADN que sirve de molde (cadena original), se generan dos cadenas dobles de ADN, formadas por una cadena original y una cadena nueva (cadena hija) que contienen la misma información genética para la división celular. Transcripción del ADN a ARN: proceso para la transmisión de la información almacenada en el ADN de doble hebra hacia una cadena sencilla de ARN que lleva la información requerida para la producción de una proteína particular. Traducción del ARN a proteínas: lectura y traducción del código genético que proviene del ADN y que se transporta al citoplasma en tripletes de ARN para convertirse en una proteína, aminoácido por aminoácido.

El ARN y la transcripción

A pesar de contar con el mismo material genético, las células del cuerpo humano poseen características totalmente diferentes; una célula ósea, una célula sanguínea, una neurona, una célula epitelial y una célula muscular, difieren cada una con respecto a la otra en la forma, el tamaño, la localización y la función. Estas diferencias se originan de células madre que contienen un material genético totalmente idéntico, pero que se procesa de forma diferente dependiendo del medio circundante y de los mecanismos celulares intrínsecos que permiten la organización de los diferentes sistemas en el cuerpo humano. De los 3,2 billones de nucleótidos presentes en los 23 pares de cromosomas, sólo el 2 % (64 millones de nucleótidos) se ha demostrado que es codificante o que puede ser transformado a proteína [7], siendo el paso de ADN a ARN (transcripción), un paso esencial y determinante en la diversidad celular.

La transcripción se ha descrito como el paso de la información almacenada en las hebras de cadena doble de ADN a cadenas sencillas de ARN, el cual lleva consigo las tripletas específicas que darán forma a la proteína, aminoácido por aminoácido (ver figura 4). Este mecanismo permite en parte la selección, el procesamiento y el transporte del ARN a los ribosomas para la producción de las proteínas que mantienen la forma, el tamaño, la localización y la función de cada célula en su ambiente específico. El tipo de almacenamiento y las modificaciones químicas que alteran la función del ADN sin cambiar su secuencia es denominado epigenética, la cual determina los genes o partes del ADN que pueden ser accesibles por las proteínas encargadas de hacer la conversión a ARN. Los mecanismos epigenéticos o epigenoma comprenden la

metilación del ADN, la modificación de las histonas (proteínas que empaquetan el ADN) y los mecanismos de impronta genética, es decir, de información parental, que facilitan o dificultan el acceso a determinadas secuencias del ADN [1, 14].

El empaquetamiento del ADN en los cromosomas se realiza con la ayuda de las histonas, que permiten que un ADN superenrollado se envuelva a su alrededor formando estructuras conocidas como nucleosomas que a su vez se enrollan y forman estructuras cada vez más compactas hasta dar lugar a los cromosomas (ver [figura 3](#)). A las regiones en el cromosoma con mayor compactación del ADN se le conoce como heterocromatina y a las de menor compactación como eucromatina; en estas últimas es donde se encuentra mayor actividad transcripcional y en las que se ubican regiones determinantes en los procesos de mantenimiento de la forma, el tamaño, la localización y la función de cada célula [1]. Este proceso que fue considerado como accesorio en el empaquetamiento del ADN, cada vez adquiere mayor utilidad biológica y comienza a ser determinante en la práctica médica por su participación en diferentes enfermedades [15].

El actor principal de la transcripción es el ARN, el cual se diferencia del ADN en el azúcar que lo compone, siendo una desoxirribosa la del ADN y una ribosa la del ARN, en el reemplazo del nucleótido timina (T) por el uracilo (U) y que usualmente se presenta como una hebra sencilla, a diferencia del ADN que es de doble hebra. Estas características del ARN llevan a que sea fácilmente degradado en la célula y que a excepción de algunos virus, no almacene información genética como lo hace el ADN. También es importante nombrar que hay varios tipos de ARN como: *i*) ARN mensajero (ARNm) que lleva la información almacenada en el ADN hacia los ribosomas; *ii*) ARN de transferencia (ARNt) que se encarga de adicionar los aminoácidos a la proteína en formación según cada tripleta específica en el ARNm; *iii*) ARN ribosomal (ARNr) que forma los ribosomas en conjunto con proteínas ribosomales, y es esencial para la interacción del ARNm y el ARNt (ver [figura 4](#)), y además, *iv*) ARN no codificantes (ARNnc), como los ARN interferentes que empiezan a ser centrales en los procesos de regulación genómica [1].

La transcripción tiene dos fases esenciales en la transmisión del mensaje del ADN a la proteína: la producción de la hebra de ARN a partir de una de las hebras de ADN y el procesamiento de la hebra de ARN para llevar el mensaje adecuado que se traducirá a proteína y evitar que sea dañada en su camino a los ribosomas. Estos mecanismos requieren la participación de varios actores que permiten seleccionar la secuencia específica en el ADN que será transcrita, entre los cuales están las regiones en el ADN conocidas como promotoras que indican la posición del gen en la que debe iniciarse la transcripción, y las proteínas llamadas factores de transcripción que reclutan la maquinaria necesaria para iniciarla. Cada región codificante en el ADN contiene bloques de secuencias codificantes, llamados exones, que van a hacer parte del ARNm, los cuales se encuentran separados entre sí, por bloques de secuencias no codificantes, que no participan en la producción de la proteína, denominadas intrones. Ambos bloques de secuencias son transcritos a ARN, pero antes de que sea llevado a los ribosomas, los intrones son removidos y los exones se unen en un proceso conocido como empalme (del inglés *splicing*), que dará origen al ARNm maduro el cual, una vez en el ribosoma, genera una secuencia de aminoácidos que dará forma a una proteína que va a hacer parte de una dinámica celular [13].

Los mecanismos que regulan la transcripción han mostrado que la expresión de genes puede estar controlada desde el exterior de la célula por factores solubles como el estrógeno, pasando por diferentes proteínas presentes en el citoplasma y llegando hasta secuencias presentes en el mismo gen que determinan la cantidad y variedad de las proteínas en nuestro organismo. El dogma central de la biología ADN $\rightarrow$ ARN $\rightarrow$ proteína termina perdiendo todo sentido al identificar que hay proteínas que regulan la disponibilidad o no del ADN para la transcripción, que hay ARN no codificante necesario para el ensamblaje de las proteínas, que a su vez pequeñas piezas de ARN son capaz de unirse al ARNm e inhibir su paso a proteína. Estos son sólo algunos de los mecanismos descritos en la actualidad, resaltando que es un campo de estudio al que han llegado muchos investigadores con base en las posibilidades que presenta el 98 % del ADN que es no codificante, el cual es transcrita de ADN a ARN en su mayoría y que hasta el momento es muy poco lo que se conoce sobre la función e implicación en el campo de la medicina [16].

Las proteínas y la traducción

Al igual que la genómica, la proteómica (estudio de las proteínas) como conjunto y su participación en la célula, asumió la responsabilidad de resolver los misterios del ser humano desde el conocimiento de las proteínas, lo que logró mover la ilusión frustrada de la genómica al producto final de la vía ADN $\rightarrow$ ARN $\rightarrow$ proteína. Este auge fue muy corto comparado con el de la genómica, debido a la variabilidad intrínseca que existe de una célula a otra en la cantidad, la localización y la actividad de cada proteína; además, de diversas modificaciones que se llevan a cabo en las proteínas después de ser ensambladas en los ribosomas [17]. Estos cambios facilitan que la célula sea un sistema dinámico que está en constante transformación y que tiene la posibilidad de autorregularse para mantener la forma, el tamaño, la localización y la función celular que se requiere en un tejido específico. La era de las ómicas y la biología computacional son la respuesta que se ha generado a las inquietudes que deja una visión científica reduccionista de la vida, la cual se intentó explicar desde una sola molécula. Actualmente, la biología molecular desde la medicina asume una visión sistémica del organismo, para entender, con ayuda de las nuevas herramientas moleculares, los procesos patológicos como procesos complejos y dinámicos que requieren aproximaciones diagnósticas y terapéuticas con las mismas características [18, 19].

Los mecanismos que permiten la producción de las proteínas ya han sido mencionados en los párrafos anteriores, pero es necesario recopilar de forma breve, la interacción de los actores claves del paso del ARN a las proteínas y cómo llegan a desempeñar su función. El punto de inicio de la traducción es un ARNm maduro, es decir, sólo con los exones necesarios para producir la proteína en particular; cabe aclarar que el empalme del ARN no sólo elimina los intrones, también puede eliminar algunos exones para producir diferentes isoformas de una proteína. Una vez el ARNm sale del núcleo y llega a los ribosomas que se encuentra en el citoplasma, se encuentra con los ARNt y los ARNr, que como se describió anteriormente, van a ser esenciales en la interpretación de las tripletas que trae el ARNm y la traducción de las tripletas, poniendo aminoácido por aminoácido hasta formar una cadena de aminoácidos o cadena polipeptídica, que da forma a la proteína (ver [figura 4](#)) [1].

La configuración tridimensional de la proteína y los cambios necesarios para que la proteína tenga un lugar y una actividad en la célula está determinada por las modificaciones postraduccionales, es decir, cualquier cambio que ocurra después de la traducción, las cuales se inician en el retículo endoplásmico, pasan al aparato de Golgi y luego darse en cualquier parte de la célula. Así, a medida que nos adentramos en la dinámica de la célula vamos a encontrar que la visión teleológica que considera a cada componente molecular con una función definida, se revalida y da cuenta que los componentes de la célula interactúan en tiempo y espacio determinados, dando como resultado patrones que pueden ser identificables pero no predecibles fácilmente. Por esta razón, la medicina debe comprender la diversidad de los seres humanos en el nivel molecular, celular y tisular, construyendo las herramientas necesarias para asumir una medicina personalizada, donde las condiciones patológicas puedan tener aproximaciones diferentes que concluyan en tratamientos totalmente disímiles a los convencionales [10].

Métodos de aislamiento de ADN y ARN en el laboratorio clínico

El rápido crecimiento del conocimiento científico y tecnológico en el área de la biología molecular está realizando un cambio discreto, pero estructural de la visión actual de la medicina. La imperiosa necesidad de generar desde la investigación científica un conocimiento útil y que sea aplicado continuamente a la solución de problemas biológicos, con el soporte del desarrollo tecnológico, ha venido creando una nueva visión de la medicina y el laboratorio clínico. Este avance dirigido y coordinado, poco a poco introduce las ómicas y los análisis sistémicos de los pacientes y las enfermedades al análisis clínico; para los cuales los médicos, el personal del laboratorio y otros profesionales del área de la salud, deben contar con los elementos teóricos necesarios para comprender, discriminar, usar e interpretar las herramientas moleculares que den respuestas útiles y confiables ante las necesidades del día a día en el quehacer médico. Esta revisión, que da cuenta del paso de la biología molecular por la medicina, es apenas un abrebocas a las técnicas y tecnologías moleculares usadas actualmente en los laboratorios clínicos, así como de la utilidad clínica de estas pruebas en nuestro medio; temáticas que se pretenden abordar en futuras entregas de la revista Medicina & Laboratorio. Para esta ocasión, se describirán los métodos de aislamiento de ADN y ARN, así como el método de amplificación y análisis de ácidos nucleicos más utilizado en la actualidad en el ámbito clínico conocido como la reacción en cadena de la polimerasa.

Toma de la muestra

Los ácidos nucleicos como el ADN y el ARN se pueden obtener de diferentes fuentes y no requieren de condiciones especiales para el transporte y la conservación. La sangre total es una de las fuentes de mayor uso actualmente debido a que se pueden obtener muchas células nucleadas de un paciente, y las condiciones seguras y estandarizadas para la toma de la muestra en cualquier laboratorio clínico. La sangre debe ser obtenida con el anticoagulante etilendiaminotetraacetato (EDTA) o ácido-citrato-dextrosa (ACD), para ayudar a la separación por centrifugación de los glóbulos blancos, los glóbulos rojos y

el plasma. A pesar de que los glóbulos blancos son una pequeña población de la sangre total, se puede obtener alta cantidad de ácidos nucleicos para el análisis; en el caso del ADN se puede encontrar una cantidad aproximada de 5 pg por célula y en 4 mL de sangre periférica hasta 100 µg de ADN total, cantidad suficiente para realizar diferentes pruebas. El plasma es otra fuente de ADN y ARN, provenientes de células muertas y virus circulantes, los cuales pueden ser fácilmente aislados y analizados a partir de esta muestra [20].

Otras muestras que pueden ser utilizadas para la obtención de ácidos nucleicos son las gotas de sangre seca en papel filtro o absorbente [21], las cuales son utilizadas generalmente en tamizajes del recién nacidos y en estudios que requieran ser remitidas a otras ciudades o países, o almacenadas por largos periodos de tiempo. En estos casos, la muestra es tomada por punción capilar en el dedo del paciente, saturando con sangre una zona demarcada de un papel filtro y dejándola secar, el cual es empacado y sellado al vacío y enviado al sitio de procesamiento. Los protocolos de aislamiento de alto rendimiento y los equipos de análisis, cada vez requieren menor cantidad de ácidos nucleicos para realizar las diferentes pruebas y abren un panorama amplio de posibles muestras a analizar, donde los fluidos biológicos como la orina, la saliva, el líquido cefalorraquídeo, el semen, las secreciones vaginales, las heces fecales, entre otros, pueden ser utilizados para la obtención de ácidos nucleicos de células nucleadas, patógenos o extracelulares presentes en las muestras. Además de los fluidos biológicos, las muestras anatómicas frescas, congeladas o fijadas por corto o largo tiempo pueden ser utilizadas para la extracción de material genético, especialmente ADN, debido a que algunos factores como el tiempo de procesamiento, la presencia de enzimas ribonucleasas, altas cantidades de lípidos y carbohidratos, y la hemólisis pueden afectar la estabilidad del ARN, posterior a la extracción de la muestra [20].

Aislamiento de ácidos nucleicos

■ Aislamiento de ADN

La extracción del ADN inicia con la homogenización del tejido o lisis celular, dependiendo de la muestra obtenida. Este primer paso está acompañado de detergentes y algunas enzimas líticas que permiten la separación de las células en el tejido, y el daño de la membrana celular y nuclear para la liberación del contenido celular, entre ellos las proteínas, el ADN y el ARN. Posteriormente, se utiliza la enzima proteinasa K para separar los ácidos nucleicos de las proteínas y una ribonucleasa para eliminar el ARN; el ADN es purificado con una solución de fenol-cloroformo en columnas de sílica o por una precipitación salina, para dejar en solución el ADN celular o genómico [22]. El producto de este procesamiento es precipitado con etanol y recuperado por centrifugación, y el ADN es resuspendido y cuantificado para determinar la concentración obtenida (ver [figura 5](#)). Aunque la extracción manual es sencilla y permite obtener una alta calidad y cantidad de ADN a bajo costo, la posibilidad de realizar el aislamiento de ADN automatizado, utilizando columnas de sílica o esferas magnéticas, da un mayor rendimiento en el procesamiento de múltiples muestras, evita errores de manipulación y la contaminación, en las diferentes etapas del proceso. El rendimiento con el método manual puede brindar

mayores concentraciones de ADN, no obstante, el ahorro de tiempo y las condiciones de trazabilidad de las muestras, hace que los equipos automatizados sean preferidos para el aislamiento en los laboratorios clínicos [22].

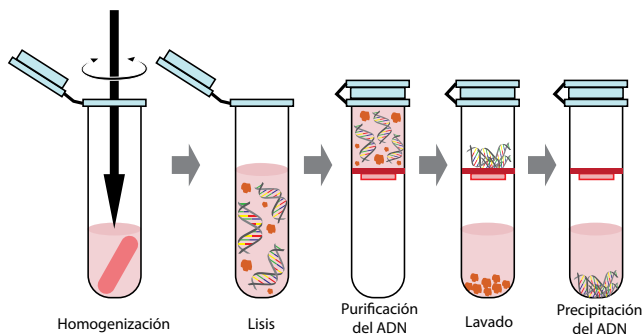


Figura 5. Procedimiento para el aislamiento y purificación de ADN por el método de fenol-cloroformo.

■ Aislamiento de ARN

Para el aislamiento del ARN se realiza un procedimiento similar al del ADN, pero bajo condiciones estrictas de protección de las cadenas sencillas de ARN, las cuales son altamente inestables y son degradadas fácilmente por ribonucleasas [22]. En el aislamiento de ARN se debe asegurar una cadena de frío y la inhibición de las ribonucleasas presentes en la suspensión, el medio circundante y los elementos utilizados durante el procedimiento; para esto, se debe limpiar el mesón, los reactivos, los elementos de protección y los equipos a utilizar con inhibidores de ribonucleasas, presentes en las soluciones de homogenización y de lisis celular. El método basado en fenol junto con el isotiocianato de guanidino es el más utilizado en la actualidad; este método permite purificar el ARN y posteriormente, precipitarlo con etanol para ser resuspendido y cuantificado. Es importante mencionar que el ARN total, en su gran mayoría, está conformado por el ARN ribosomal y una pequeña parte corresponde al ARN de transferencia, el ARN mensajero y los ARN no codificantes. En estuches comerciales se pueden encontrar protocolos específicos para el aislamiento de ARN mensajeros que contengan la secuencia repetida de adeninas (colas de poli-A), las cuales se unen a deoxitimidinas repetidas (poli-dT) que están adheridas a una fase sólida en el estuche. Asimismo, se encuentran actualmente estuches que permiten aislar microARNs o ARN no codificantes de 22 nucleótidos de extensión, los cuales se han descubierto que tienen un rol fundamental en diferentes procesos patológicos [22].

Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de la concentración del ADN y el ARN en las muestras procesadas se puede realizar con un espectrofotómetro convencional. Actualmente existen en el mercado espectrofotómetros que pueden realizar la cuantificación de los ácidos nucleicos en un volumen de 0,5 μ L a 2 μ L de la muestra, sin necesidad de cubetas, a una longitud de onda de 260 nm; se utiliza además la lectura a 280 nm para identificar la contaminación de la muestra con proteínas (ver figura 6) [22]. A partir de la lectura a 260 nm se ha estimado que una absorbancia corresponde a 50 μ g/mL de ADN, entonces el ADN (en μ g/mL) presente en una

solución corresponde a $50 \times A_{260}$ y la relación entre A_{260}/A_{280} con un valor $> 1,8$ da cuenta de la pureza de ADN aislado. De la misma manera, a 260 nm, una absorbancia corresponde a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ARN, de esta manera, el ARN (en $\mu\text{g}/\text{mL}$) presente en la muestra es equivalente a $40 \times A_{260}$ y la pureza del ARN con un valor > 2 en la relación A_{260}/A_{280} [22].

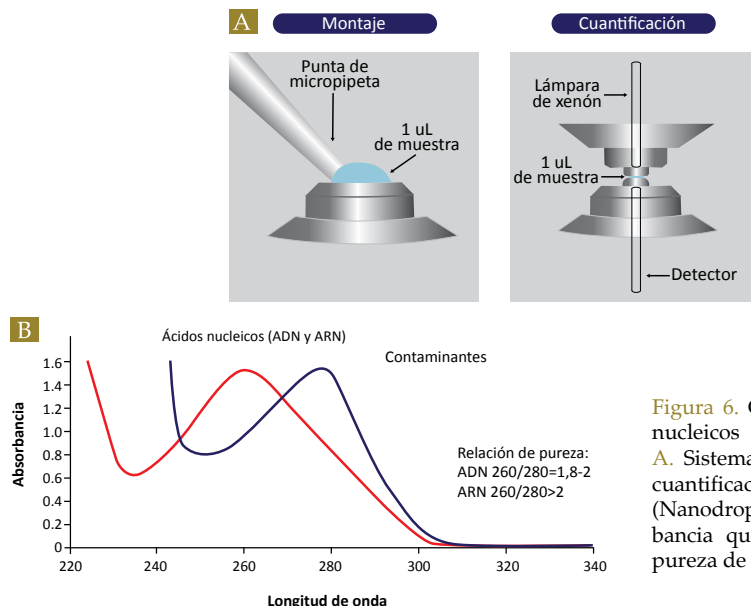


Figura 6. Cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría. **A.** Sistema espectrofotométrico de cuantificación de ácidos nucleicos (Nanodrop). **B.** Gráfico de absorbancia que permite identificar la pureza de los ácidos nucleicos.

Almacenamiento y transporte de muestras

Los factores pre-analíticos como el almacenamiento y el transporte de las muestras de ADN o ARN deben tener las condiciones necesarias para evitar la degradación, la contaminación o contacto con el medio externo, independiente si las muestras son líquidas o sólidas (papel filtro). El transporte de la muestra se debe realizar en un contenedor doble, para que si se compromete uno de los recipientes, el segundo de ellos pueda evitar el daño o la contaminación de la muestra. Si la muestra es líquida debe estar envuelto en un material que absorba todo el contenido y evite derrames de la muestra en el ambiente (ver figura 7). Las muestras deben tener toda

la información necesaria para identificar el paciente, la(s) prueba(s) a realizar, el área del laboratorio o el nombre y la dirección del laboratorio externo al que se dirige la muestra. La temperatura de almacenamiento se debe conservar y evitar romper la cadena de frío, en especial el ARN, el cual debe ser conservado por debajo de -20°C ; el ADN aislado aunque es

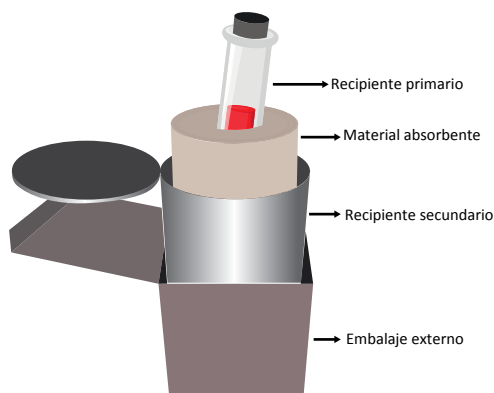


Figura 7. Condiciones ideales para el transporte de muestras de sangre.

mucho más estable y puede ser almacenado a corto plazo a temperatura ambiente, se sugiere que se conserve a 4 °C en periodos cortos o por debajo de -20 °C en periodos largos [20].

Amplificación de ácidos nucleicos

La evaluación de una secuencia de ADN o ARN *in vitro* requiere de un método de amplificación del ácido nucleico blanco o específico para obtener una cantidad de moléculas que alcance el límite de detección necesario para la visualización o cuantificación del ADN o ARN. Existen diferentes métodos para la amplificación y evaluación del ADN; esta revisión está enfocada particularmente en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés: *Polymerase Chain Reaction*) y algunas de las variaciones realizadas a la técnica hasta el momento. El objetivo es poder identificar brevemente los principios que fundamentan la técnica y las principales condiciones analíticas a tener en cuenta en la práctica clínica para la prevención, apoyo diagnóstico y seguimiento de algunas enfermedades.

Reacción en cadena de la polimerasa

Uno de los hitos históricos en el avance de la biología molecular fue el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa, que en conjunto con la tecnología del ADN recombinante, ha sido determinante en el cambio de visión de la biología celular a una biología molecular, la cual poco a poco ha venido impregnando la medicina [23]. La reacción en cadena de la polimerasa utiliza el mecanismo biológico de la replicación celular para la duplicación en serie de fragmentos específicos de ADN (ver figura 8). La prueba utiliza un par de cebadores sintéticos que delimitan la región del ADN genómico a amplificar; y una vez unidos de forma complementaria al ADN molde, son reconocidos por la ADN polimerasa para iniciar la replicación de la cadena. La repetición cíclica de tres procesos basados en la temperatura (desnaturalización, hibridación y extensión), junto con la adición de desoxinucleótidos y la participación de la ADN polimerasa, posibilita la síntesis de cadenas dobles complementarias de ADN delimitadas por los cebadores; fragmento de ADN que será amplificado de manera geométrica hasta alcanzar el número de copias deseado o llegar al punto final de la reacción [24, 25].

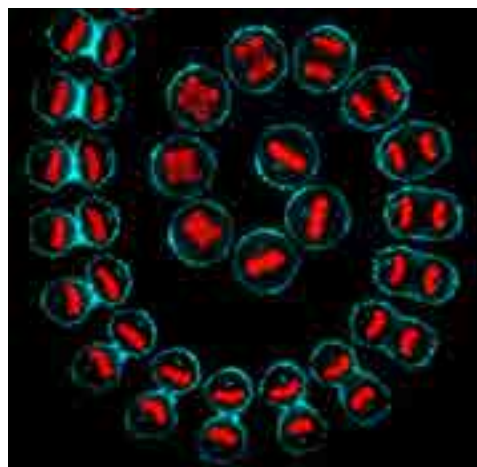


Figura 8. Microscopia confocal de una célula cancerígena en división. La fotografía muestra un registro en el tiempo del proceso de replicación celular donde se puede ver en azul la membrana celular y en rojo el ADN. CIL: 41732 de Kuan-Chung Su y Mark Petronczki.

■ Componentes de la reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa tiene una serie de componentes que son claves para el adecuado desarrollo de la prueba (ver figura 9). En primer lugar es esencial tener un aislamiento

de ADN genómico del paciente o ADN de la muestra con una alta pureza, evitando al máximo cualquier contaminación cruzada con células externas, microorganismos o ADN libre, que pueda generar la amplificación de material genético que no corresponda con el ADN de estudio y arrojar resultados falsos positivos o resultados alterados. Los cebadores deben ser secuencias cortas de ADN conocido, complementarios al ADN genómico que se desea amplificar, y diseñados para ayudar a la eficiencia de la prueba, evitar uniones inespecíficas que darán resultados falsos positivos y prevenir resultados falsos negativos debido a problemas en la eficiencia de la amplificación. Para el adecuado desarrollo de la prueba es necesario la adición en exceso de desoxinucleótidos trifosatos (dNTPs) de adenina, timina, citosina y guanina (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) para ser incorporados en las nuevas cadenas de ADN, así como la solución buffer apropiada para mantener el pH y aportar los iones requeridos en el funcionamiento de la ADN polimerasa, la cual reconoce los cebadores unidos de forma complementaria al ADN molde para iniciar la formación de las cadenas hijas; el ADN molde servirá de plantilla para la adición de los desoxinucleótidos complementarios en el extremo 3' del cebador, a partir del cual será extendido (ver figura 9, tabla 1).

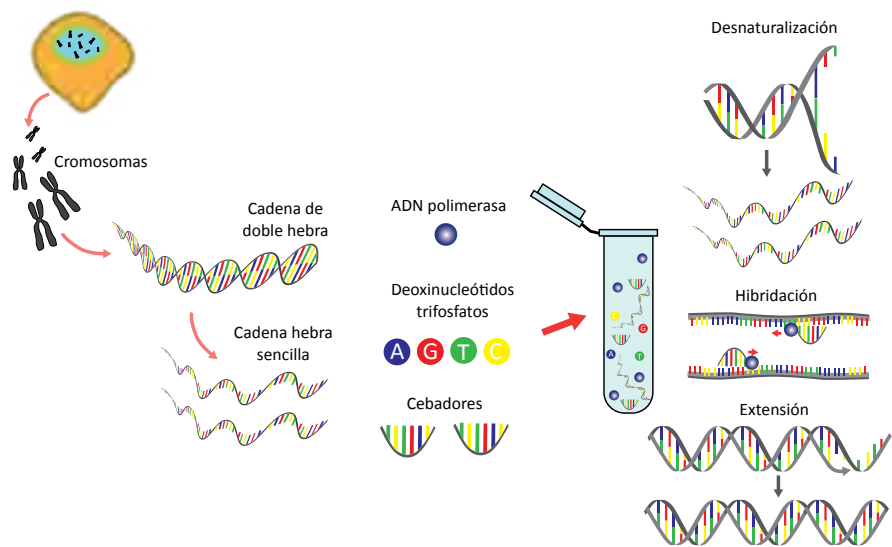


Figura 9. Componentes necesarios para el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa. La representación esquemática muestra el aislamiento de ADN de doble hebra, la mezcla del ADN con los cebadores, los deoxinucleótidos y la ADN polimerasa; así como las fases de desnaturalización, hibridación y extensión de las secuencias de nucleótidos en la reacción.

Tabla 1. Componentes de una reacción en cadena de la polimerasa	
Tris-HCl, pH 8,3	10-50 mM
Cloruro de magnesio	1,2 – 2,5 mM
Cloruro de potasio	50nM
Deoxinucleótidos trifosatos	200 µM cada uno
ADN polimerasa	0,5 – 5 UI
Albumina sérica bovina	100 µg/mL
Cebadores	0,1 – 10 µM
ADN genómico	1 – 10 ng

La protagonista de la reacción en cadena de la polimerasa es la enzima conocida como taq ADN polimerasa, proveniente de las bacterias termófilas *Thermus aquaticus* descubiertas por Thomas Brock en 1969 en el parque nacional de Yellowstone, Estados Unidos [26]. La capacidad de estas bacterias de sobrevivir a temperaturas de 55 °C a 80 °C, generó un precedente en el desarrollo de la reacción en cadena de

la polimerasa. Antes del descubrimiento, las hebras de ADN eran incubadas con los cebadores y replicadas por una ADN polimerasa proveniente de la bacteria *Escherichia coli*; ésta enzima debía ser reemplazada cada nuevo ciclo de la prueba en el proceso de desnaturalización, en el cual se separa la cadena doble de ADN a 95 °C, debido a que esta temperatura también afectaba a la enzima. En 1986, científicos de la corporación Cetus logran aislar la polimerasa taq de la bacteria *T. aquaticus*, enzima que es activa a temperaturas de 70 °C a 80 °C y que puede resistir temperaturas por encima de 95 °C [27]. Gracias a la invención del termociclador en 1987 por Perkin-Elmer, aparato que realiza los ciclos de temperatura necesarios para la replicación del ADN de forma automática, y al aislamiento de la enzima taq ADN polimerasa, la reacción en cadena de la polimerasa se pudo realizar en el mismo tubo y de manera automatizada, sin procedimientos adicionales, lo que evita al máximo la contaminación y mejora considerablemente la eficiencia de la prueba [28].

Son muchos los cambios e innovaciones que se han realizado sobre la idea inicial de la reacción en cadena de la polimerasa, pero en esencia se ha logrado mantener el principio fundamental de la prueba por más de 30 años [2]. Los avances en el desarrollo de enzimas que se activan o inactivan a determinadas temperaturas, las mejoras en la fidelidad de la enzima para evitar y corregir errores en la incorporación de nucleótidos, la velocidad en la formación de las copias de ADN, la incorporación de otras enzimas para el paso de ARN a ADN, el uso de múltiples cebadores para regiones diferentes o para delimitar una región específica, la adición de sondas fluorescentes para cuantificar la producción de cadenas en tiempo real, el uso de magnesio, dimetilsulfoxido, betaina, 7-deasa-GTP para mejorar la eficiencia de la reacción, son algunos de los avances realizados hasta el momento [24].

Diseño de cebadores para la secuencia blanco

La correcta selección del par de cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa es uno de los principales determinantes para obtener un buen resultado en la técnica. La especificidad y complementariedad de los cebadores a la secuencia blanco es fundamental, no puede haber hibridación de los cebadores con ninguna otra secuencia en el genoma o entre ellos mismos, se debe tener especial interés en evitar las secuencias repetidas o secuencias homólogas que puedan interferir con la amplificación producto de la unión de los cebadores en múltiples sitios. El tamaño de los cebadores debe ser entre 20 y 40 nucleótidos, un tamaño menor puede tener mayor probabilidad de uniones inespecíficas y un mayor tamaño, puede disminuir la eficiencia de unión [25, 29].

Otros dos factores importantes a tener en cuenta para el diseño de los cebadores es el contenido de pares de nucleótidos guanina – citosina y adenina – timina, y la influencia que pueden tener en la temperatura de fusión (del inglés *melting temperature*) de los cebadores [30]. Altos contenidos de guanina y citosina, así como cebadores muy largos, pueden alterar la temperatura de fusión, definida como la temperatura a la cual la mitad de la doble hebra de una secuencia está unida y la otra mitad separada, lo que reduce la eficiencia de la reacción ciclo tras ciclo y genera fallas en los resultados. Por esta razón, se recomienda que cada cebador contenga un contenido de 45 % a 55 % de guanina-citosina y una temperatura de fusión igual en los dos cebadores entre 55 °C - 80 °C [29, 30]. Actualmente existen herramientas informáticas para el diseño adecuado de los cebadores que permiten la búsqueda de secuencias en el ADN que cumplan con las características ideales; asimismo, los estuches comerciales usados

para diagnóstico molecular se han validado y cumplen con las condiciones ideales para el reconocimiento de las secuencias blanco.

■ Ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa

Como ya se ha mencionado, la reacción en cadena de la polimerasa es una vía fácil y rápida para copiar y amplificar pequeños fragmentos de ADN. Esta técnica está basada en cambios cíclicos de temperatura que inducen: *i)* la desnaturalización o separación de las cadenas de doble hebra complementaria de ADN del paciente o muestra seleccionada, *ii)* la hibridación o unión de los cebadores a las hebras molde de cadena sencilla, y *iii)* la extensión, que corresponde a la síntesis de la nueva cadena de ADN complementaria por la ADN polimerasa a partir del cebador y usando el ADN molde como plantilla [1, 24]. La secuencia ininterrumpida de estas tres fases en un termociclador, puede duplicar los fragmentos de ADN de hebra sencilla presentes en la fase de desnaturalización, hasta lograr de miles a millones de copias de ADN de doble cadena en la última fase de extensión en tan sólo dos horas de procesamiento, hasta alcanzar un efecto meseta (del inglés *plateau*) al final de la reacción por agotamiento de los reactivos (ver [figura 10](#)) [1].

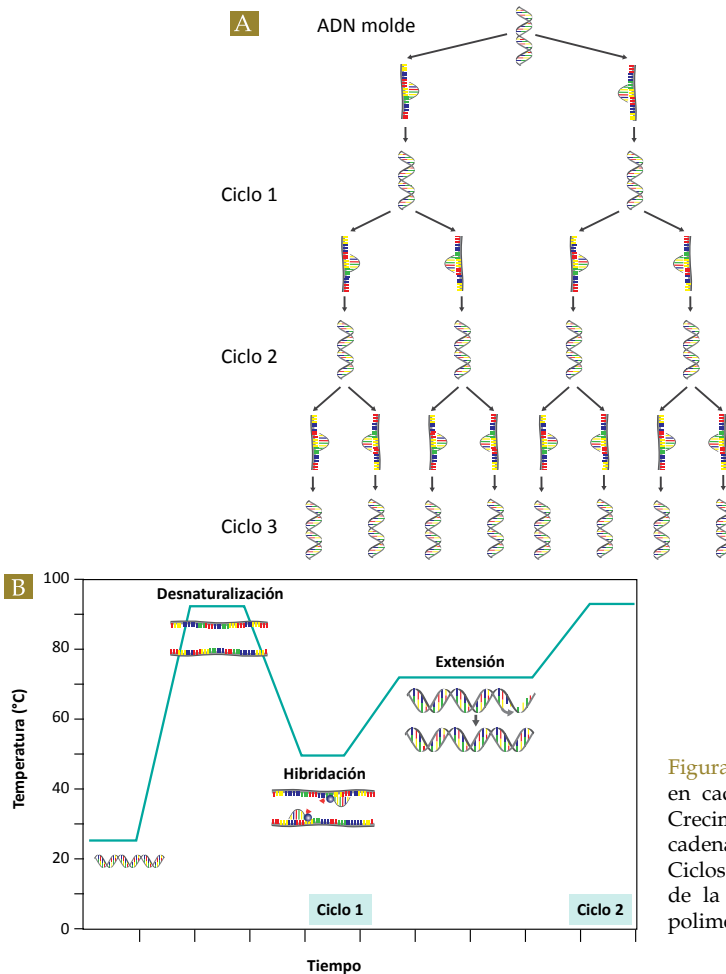


Figura 10. Ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa. **A.** Crecimiento exponencial de las cadenas blanco de ADN y **B.** Ciclos de temperatura y fases de la reacción en cadena de la polimerasa.

La primera fase a la que son sometidas las muestras que contienen el ADN a analizar, es la desnaturalización, la cual se realiza a una temperatura superior a 90 °C para permitir la desestabilización y separación de los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las bases nitrogenadas de la cadena doble de ADN, pero sin afectar los enlaces fosfodiéster formados por los grupos fosfato con el azúcar de desoxirribosa y que permiten la integridad de la hebra sencilla (ver figura 10). En esta fase es necesario tener en cuenta que la ADN polimerasa es termoestable y puede resistir la temperatura de desnaturalización sin afectar la función de la enzima, y que las moléculas de ADN presentes en la solución son separadas en hebras simples para exponer los sitios complementarios necesarios para la unión de los cebadores específicos de la prueba que se vaya a realizar [1].

La segunda fase es la hibridación o alineamiento de los cebadores con las hebras sencillas de ADN presentes en la solución o entre las hebras sencillas de ADN complementarias, que forman así, cadenas de ADN sencillas con pequeñas regiones de doble cadena donde están unidos los cebadores y cadenas dobles de ADN original. Para llevar a cabo este paso, se debe reducir la temperatura a un rango de 40 °C - 70 °C para permitir la unión de los cebadores con las regiones complementarias del ADN molde; en este punto, es esencial conocer la temperatura de fusión de los cebadores, es decir, la temperatura a la cual la mitad de la cadena se une a la contraparte complementaria (ver figura 10) [29]. La temperatura de hibridación es 5 °C por debajo de la temperatura de fusión, y el rango tan amplio de temperatura va a depender de los nucleótidos que conforman la secuencia [25]. Es importante recordar que la unión de los nucleótidos adenina y timina requiere de dos puentes de hidrógeno y por ende menor energía para la unión/separación de estas uniones, contrario a los nucleótidos citosina y guanina que forman tres puentes de hidrógeno y con ello una demanda de mayor energía; una alta cantidad de citosina y guanina en la secuencia representa una temperatura de fusión y de hibridación alta [25].

La tercera fase del ciclo es conocida como la extensión o elongación, este nombre se debe al proceso que realiza la ADN polimerasa, que reproduce el proceso de duplicación del material genético que se lleva a cabo en las células para la replicación celular (ver figura 10). La enzima termoestable taq ADN polimerasa, o actualmente la pfu ADN polimerasa (aislada de la Archaea *Pyrococcus furiosus*, y que produce menor cantidad de errores en la secuencia), está encargada de generar una hebra de ADN complementaria de una región específica de ADN en dirección 5'→3', a partir de los extremos 3' libres de los dos cebadores o iniciadores que están unidos a las hebras molde del ADN original, para obtener copias exactas de hebras de cadena doble del fragmento seleccionado [27]. A modo de ejemplo, podemos asumir que los cebadores se diseñan para unirse en dirección 3'→5' en el inicio de la secuencia blanco y 5'→3' al final de la secuencia complementaria, de esta forma se asegura que la extensión que realiza la ADN polimerasa, a partir de los extremos 3' en ambos cebadores, genera una secuencia complementaria sólo de la región de interés. La temperatura más utilizada a la que se realiza esta fase es a 72 °C, dado a que la actividad óptima de la enzima es de 75 °C a 80 °C; el uso de esta temperatura permite que algunos protocolos sólo utilicen dos temperaturas, una para la desnaturalización y otra para la hibridación y extensión, lo que mejora la eficiencia de la prueba [31].

Tabla 2. Crecimiento exponencial de ADN en la reacción en cadena de la polimerasa	
Ciclo de PCR	Cantidad de secuencias
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1.204
20	1.048.576
30	1.073.741.824
40	1.099.511.627.776

La reacción en cadena de la polimerasa está basada en la repetición continua de 20 a 40 ciclos de las tres fases, cada una aproximadamente de un minuto: desnaturalización (> 90 °C), hibridación (40 °C – 70 °C) y extensión (72 °C) (ver [figura 10](#)); que duplica de forma exponencial el número de cadenas iniciales de ADN de doble hebra para la identificación en su punto final. Posterior a la amplificación de la secuencia del ADN blanco se corrobora la presencia o ausencia de la molécula de ADN por diferentes métodos, siendo el más utilizado la electroforesis en gel de agarosa. El número de secuencias duplicadas es determinante para la visualización del ADN en un gel de agarosa, al igual que la presencia de un compuesto fluorescente

que se intercale entre las pares de bases de la secuencia de ADN. Para visibilizar el ADN en un gel de agarosa debe tener una cantidad mínima de 10¹² pares de bases, proporción que puede ser obtenida tras 40 ciclos de una sola secuencia de ADN [24, 25] (ver [tabla 2](#)). La reacción en cadena de la polimerasa puede ser realizada en microviales, microplacas, capilares o tarjetas de microfluidos, que pueden procesar desde 24 hasta 380 muestras en paralelo dependiendo del equipo utilizado. El volumen final de la solución, con los componentes necesarios para realizar la prueba, puede variar de 25 a 100 µL por paciente o muestra.

Detección de ácidos nucleicos

Electroforesis en gel

Uno de los métodos más utilizados para el análisis de los productos de punto final obtenidos en la reacción en cadena de la polimerasa es la electroforesis en gel. Este método permite separar en el gel tanto ADN, como ARN y proteínas, teniendo como base la carga eléctrica, el tamaño y el punto isoelectrónico de cada molécula (ver [figura 11](#)). De acuerdo al tamaño del ADN blanco a identificar, específicamente para el obtenido por la reacción en cadena de la polimerasa, se usa un gel de agarosa o de poliacrilamida; el primero de utilidad para cadenas largas de ADN (50 - 20.000 pares de bases) y el segundo para cadenas cortas (5-500 pares de bases) [1]. La electroforesis consiste en la migración de una molécula ionizada y con carga neta (presente en el gel) tras aplicar un campo eléctrico generado en una cámara que posee un ánodo (polo positivo) y un cátodo (polo negativo) en lugares opuestos, los cuales atraerán las moléculas según su carga contraria. A medida que las moléculas migran, la red de poros de diferente tamaño presentes en el gel limita la velocidad de migración de las moléculas más grandes y facilita o acelera el paso de las moléculas de menor tamaño. Dependiendo del tiempo de la electroforesis y el tipo de gel, se obtiene un patrón de migración donde las moléculas más grandes están cerca del cátodo y las más pequeñas en el extremo del ánodo (ver [figura 11](#)) [1].

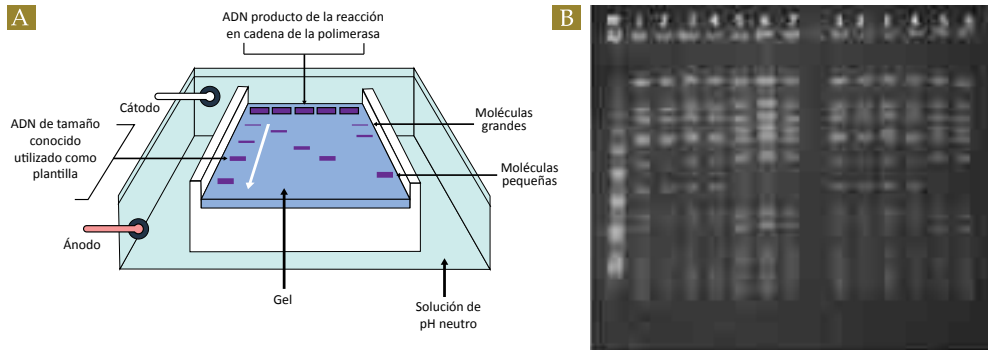


Figura 11. Electroforesis en gel. **A.** Representación esquemática de la electroforesis en gel y **B.** Gel de Electroforesis de campo pulsado (PFGE) teñido con bromuro de etidio de diferentes aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* provenientes de una institución hospitalaria. Cortesía de la Línea de investigación de Epidemiología Molecular Bacteriana del grupo de Microbiología Molecular y el grupo de investigación en Microbiología Básica y Aplicada (MICROBA), de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia.

El ADN en una solución de pH neutro tiene una carga negativa y es atraída por cargas positivas, lo que produce su migración en el gel desde el cátodo hacia el ánodo. El ADN blanco, que ha sido duplicado por la reacción en cadena de la polimerasa, migra en una región del gel de acuerdo a la cantidad de pares de bases que tiene la secuencia, y es acumulada en una banda que se ubica en paralelo a una de las bandas de tamaño determinado de un patrón comercial que contiene ADN de diferentes longitudes y que es corrido de forma simultánea a la muestra; esto, permite determinar el tamaño (peso) de la secuencia estudiada en pares de bases. Para visualizar el ADN blanco separado se utilizan agentes luminiscentes o colorantes como el bromuro de etidio, RedGel, azul de metileno, Blue View, entre otros compuestos, que pueden unirse al ADN de doble cadena y generar una señal lumínica que es directamente proporcional a la cantidad de ADN presente [24, 25]. La presencia o ausencia de una banda de ADN en un peso determinado, así como el cambio en la migración de una secuencia por mutaciones, deleciones o adiciones en el ADN en comparación a un patrón de migración, es el resultado cualitativo de mayor uso en el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa. También es posible obtener resultados semicuantitativos al evaluar la señal lumínica por densitometría y extrapolar la cantidad de ADN presente en una banda específica, con relación a una curva estándar realizada con diferentes concentraciones de ADN [32].

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

A pesar que la electroforesis en gel ha sido el método más usado para el análisis de los productos de la reacción en cadena de polimerasa de punto final, en 1992 se consigue realizar la amplificación y análisis de los productos en el mismo tubo de forma cuantitativa y en tiempo real, lo que reduce el tiempo de procesamiento, las fuentes de error y de contaminación que se pueden dar durante la electroforesis, y permite obtener resultados mucho más precisos, exactos y reproducibles [33, 34]. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa, como se conoce actualmente, ha ganado un gran reconocimiento en el área clínica al usar el principio base de la reacción en cadena de la polimerasa, pero además, incluir la lectura de una señal fluorescente para identificar y cuantificar en tiempo real la reproducción de cadenas dobles de ADN ciclo tras ciclo [35]. Las aplicaciones de la reacción en cadena de

Tabla 3. Fluoróforos empleados en técnicas moleculares		
Fluoróforo	Excitación (Longitud de onda)	Emisión (Longitud de onda)
Cascada blue	375	423
YOY-1	491	509
BODIPY-FL	503	512
Fluoresceína (FITC)	495	519
SYBR Green I	497	520
TOTO-1	509	533
FAM	495	535
TET	522	550
JOE	525	555
Cy3	552	565
POPO-3	534	570
Rodamina	540	570
NED	553	575
TAMRA	560	580
Naranja de acridina	460-502	526-650
Cy5	643	667
Red 670	480-565	670
Bromuro de etidio	526	605
ROX	580	605
Red 613	480-565	613
Rojo de Texas	596	615
Homodimero de etidio	534	616
Yoduro de propidio	536	617
IRD 700	685	705
Cy7	743	767
IRD 800	795	849
Tomado de [26]		

la polimerasa cuantitativa en la práctica clínica son diversas y se ha logrado consolidar plataformas y estuches comerciales para la discriminación de mutaciones puntuales en enfermedades genéticas, variantes oncogénicas, polimorfismos de nucleótidos simples, metilación de ADN, número de copias de ADN o ARN (carga viral), identificación de microorganismos, entre otras aplicaciones en desarrollo [2, 31, 36-43].

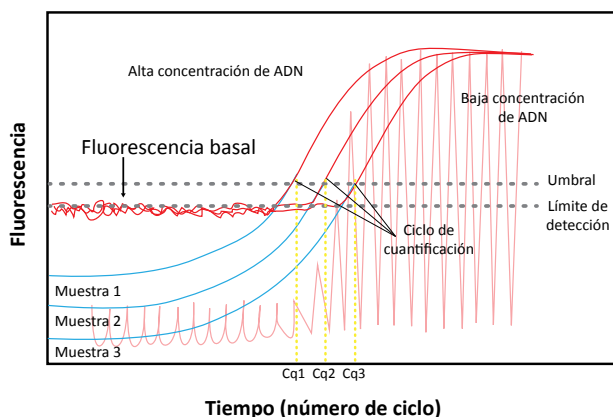
La cuantificación de ácidos nucleicos en la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa está basada en la fluorescencia, definida como un tipo de emisión de luz caracterizada por la absorción de radiación electromagnética de onda corta como la luz ultravioleta, para la posterior emisión de esa energía en una longitud de onda más larga, particularmente en el espectro de luz visible. Los fluoróforos o fluorocromos son compuestos que tienen la capacidad de generar fluorescencia en todo el espectro visible cuando son excitados a una longitud de onda específica, ampliamente utilizados en el laboratorio clínico (ver [tabla 3](#)) [24]. A diferencia del método tradicional, en la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, se adiciona al inicio de la reacción un compuesto fluorescente que se une a las cadenas dobles de ADN, de forma inespecífica o específica, y genere una señal fluorescente en tiempo real

proporcional al número de cadenas de doble hebra que se forman en cada ciclo [34].

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa mide la fluorescencia emitida por los fluoróforos en la fase de hibridación o de extensión en cada ciclo a medida que la amplificación progresa (ver [figura 12](#)). Esto permite cuantificar la amplificación de la hebra molde durante la fase exponencial de la prueba, antes de llegar a un agotamiento de los reactivos, a la acumulación de los inhibidores o la inactivación de la polimerasa, como sucede en el método tradicional [25]. Los gráficos que proporciona el software para el análisis, relacionan la intensidad de fluorescencia frente al número de ciclos y permite hacer una corrección de la fluorescencia inespecífica para generar un límite de detección y un valor umbral, que se estima por encima del límite de detección, para la identificación de la fluorescencia específica

asociada a la generación de ADN de doble hebra (ver figura 12). El número del ciclo en el cual la fluorescencia de una muestra específica cruza el umbral es conocido como el ciclo de cuantificación (Cq, del inglés *quantification cycle*, también conocido como *threshold cycle* (Ct), *crossing point* (Cp) y *take-off point* (TOP)), cuyo valor tiene una relación inversamente proporcional a la concentración inicial de la muestra. Entre mayor sea la concentración de ADN en el inicio de la reacción, la fluorescencia se podrá identificar en un ciclo menor, dando un valor del ciclo de cuantificación más bajo [25].

Figura 12. Esquema de un gráfico de fluorescencia vs. número de ciclos de tres muestras de ADN diferentes, que permite identificar el inicio de la reacción, el límite de detección de la fluorescencia, el valor umbral y los ciclos de cuantificación de cada una de las muestras.



La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa puede generar datos absolutos o relativos de acuerdo a la aplicación o resultado que se requiera. En la cuantificación absoluta, la fluorescencia producida por la muestra permite calcular el número de copias exactas, al relacionar el valor del ciclo de cuantificación de la muestra con los valores de concentraciones conocidas en una curva estándar (ver figura 13). Por su parte, la cuantificación relativa permite identificar el aumento o disminución del ADN o ARN presente en la muestra de acuerdo al ciclo de cuantificación y con base en un control de expresión constante, que permite la comparación con otras muestras. También es importante mencionar que la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa permite reemplazar el análisis cualitativo o semicuantitativo de la electroforesis en gel, e identificar la presencia o ausencia de una secuencia de ADN o sus variantes (mutaciones) al analizar la temperatura de fusión a la cual se da, se pierde o se gana la emisión de fluorescencia [24, 35]. Este análisis se realiza con una curva de disociación donde se grafica la intensidad de fluorescencia y el tiempo contra la temperatura (ver figura 14), es importante recordar que la temperatura de fusión es la temperatura a la cual la mitad de una cadena doble de ADN está unida y la otra mitad separada; cada secuencia posee una temperatura de fusión específica de acuerdo al tamaño, la complementariedad y al contenido de guanina-citosina y de adenina-timina, que permite identificar si durante la prueba hay amplificación de una cadena o de varias secuencias diferentes como es el caso de mutaciones específicas (ver figura 14) [24, 30].

Para realizar una adecuada evaluación de la formación de las cadenas de doble hebra, por cuantificación relativa, cuantificación absoluta o el análisis de la temperatura de fusión; se debe tener en cuenta el tipo de fluoróforos utilizados y el mecanismo usado para identificar la secuencia de ADN de doble cadena. La unión de los fluoróforos y la emisión de fluorescencia puede ser inespecífica o específica, como se había mencionado anteriormente, teniendo una

mayor sensibilidad y especificidad, el uso de sondas dirigidas a la secuencia blanco. En el caso de la interacción inespecífica, se presenta una activación del fluoróforo dependiente de la unión al ADN de cadena doble, como el SYBR-green, Eva-green o el bromuro de etidio, pero que no obedece a una secuencia específica de nucleótidos para la unión; este tipo de interacción puede generar falsos positivos o interferir con los resultados por la presencia de contaminantes o la hibridación inespecífica a otras secuencias (ver figura 15) [24]. Las sondas, por el contrario, están conformadas por secuencias de nucleótidos específicos que hibridan exclusivamente con el ADN blanco en una secuencia específica, y que pueden o no ser parte de los cebadores utilizados para la amplificación. A diferencia de los fluoróforos de unión inespecífica, pueden requerir de la acción de la ADN polimerasa para la emisión de luz visible; están conformadas por dos moléculas fluorescentes o una molécula fluorescente y un inactivador, y se dividen, según el mecanismo de acción, en sondas de hidrólisis o sondas de hibridación (ver figura 15) [24, 25].

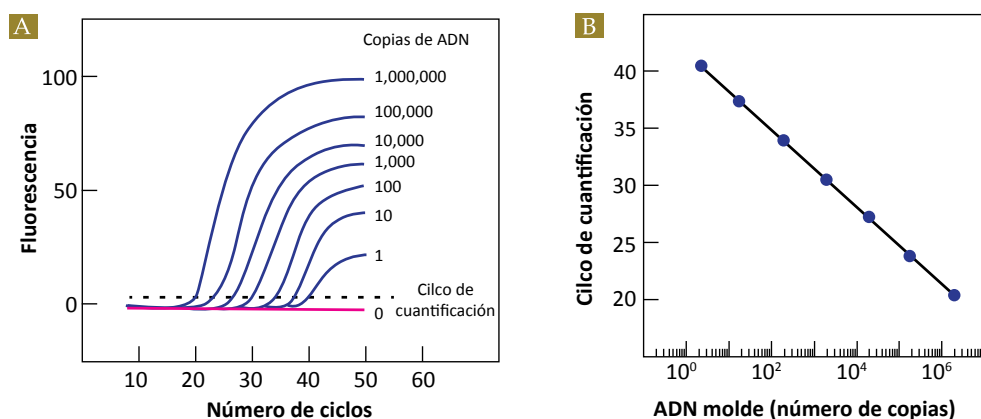


Figura 13. Cuantificación absoluta para la reacción en cadena de la polimerasa. **A.** Gráfico de fluorescencia vs número de ciclos que permite identificar el ciclo de cuantificación de muestras con diferentes concentraciones de ADN molde y **B.** Gráfico de número de ciclos vs ADN molde que permite identificar la curva estándar para la cuantificación de muestras desconocidas.

■ Sondas de hidrólisis e hibridación

Uno de los principios en los que se basa el funcionamiento de las sondas utilizadas en la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa es la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, del inglés *fluorescence resonance energy transfer*). Este fenómeno físico ocurre sólo cuando hay una interacción a muy corta distancia de dos fluoróforos o un fluoróforo con un inactivador (del inglés *quencher*), donde uno de los fluoróforos (donador) al absorber una longitud de onda específica emite en otra longitud de onda, que puede activar al fluoróforo cercano (receptor), o en el caso del inactivador, ser absorbida para evitar la emisión de luz [44]. Las sondas de hibridación dual *Hybprobe* tienen dos fluoróforos que realizan transferencia de energía a corta distancia y las sondas de hidrólisis como las *Taqman*, *Molecular beacons* y las *Scorpion*, utilizan un fluoróforo y un inactivador que evita la emisión de luz dependiendo de la distancia mediante desactivación dinámica o, mientras se encuentren unidas, por desactivación estática o por contacto.

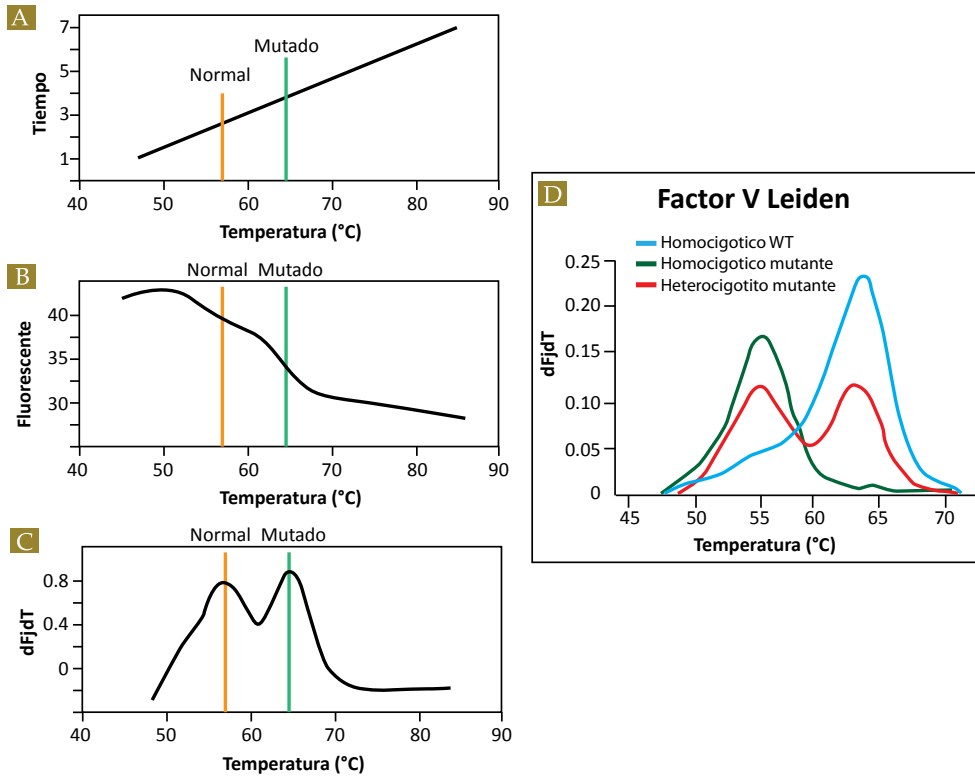


Figura 14. Análisis de la temperatura de fusión. **A.** Gráfico del tiempo vs la temperatura a la cual se asocia y disocia una secuencia normal y otra mutada en el mismo análisis, y **B.** Gráfico de la fluorescencia vs la temperatura, donde se muestra la pérdida de fluorescencia a medida que aumenta la temperatura y **C.** Gráfico de la diferencia de la fluorescencia en relación con la diferencia del tiempo (dF/dT) vs la temperatura, para obtener la curva de disociación para el análisis de la temperatura de fusión. **D.** Análisis de los genotipos homocigótico y heterocigótico del gen factor V de Leiden en una curva de disociación.

Las sondas de hibridación dual *Hybprobe* son dos cadenas de nucleótidos, diferentes a los cebadores, utilizadas en la reacción, donde una sonda lleva un fluoróforo donador en el extremo 3' y la otra sonda lleva un fluoróforo receptor en el extremo 5' (ver figura 15). Ambas sondas se hibridan en la secuencia blanco de forma específica y en una región contigua una de la otra. Dependiendo de la cercanía de ambos fluoróforos se genera una transferencia de energía, por resonancia de fluorescencia, que al activar el fluoróforo donador con una luz externa excita el fluoróforo aledaño para inducir una señal lumínica cuantificable y específica, que dependerá de la presencia o no de mutaciones o polimorfismos que afecten la distancia de ambos fluoróforos (ver figura 15) [24, 45]. Este tipo de sondas permite identificar de forma específica las secuencias blanco, debido a la presencia de cuatro sondas que requieren hibridarse para amplificar la secuencia blanco y generar una señal en cada uno de los ciclos.

Las sondas *Taqman* son cadenas de 20 a 30 nucleótidos que hibridan en la secuencia blanco en ambas cadenas y que no están asociados a los cebadores; estos, tienen un fluoróforo en el extremo 5' y un inactivador en el extremo 3' que evita la emisión de luz mientras la secuencia se mantenga intacta (ver figura 15). Posterior a la desnaturalización, la

sonda *Taqman* se hibrida con la secuencia de ADN blanco en la región que delimitan los cebadores, para luego ser eliminada en la fase de extensión gracias a la actividad exonucleasa o de remoción de nucleótidos, que posee la ADN polimerasa en el proceso de formación de la cadena de doble hebra. La remoción cada nucleótido de la sonda *Taqman* unido a la secuencia blanco, lleva a que el fluoróforo y el inactivador sean separados, lo que permite que el fluoróforo pueda emitir una señal de luz visible, que está relacionada con el número de cadenas de doble hebra generadas en cada ciclo (ver figura 15) [24, 44].

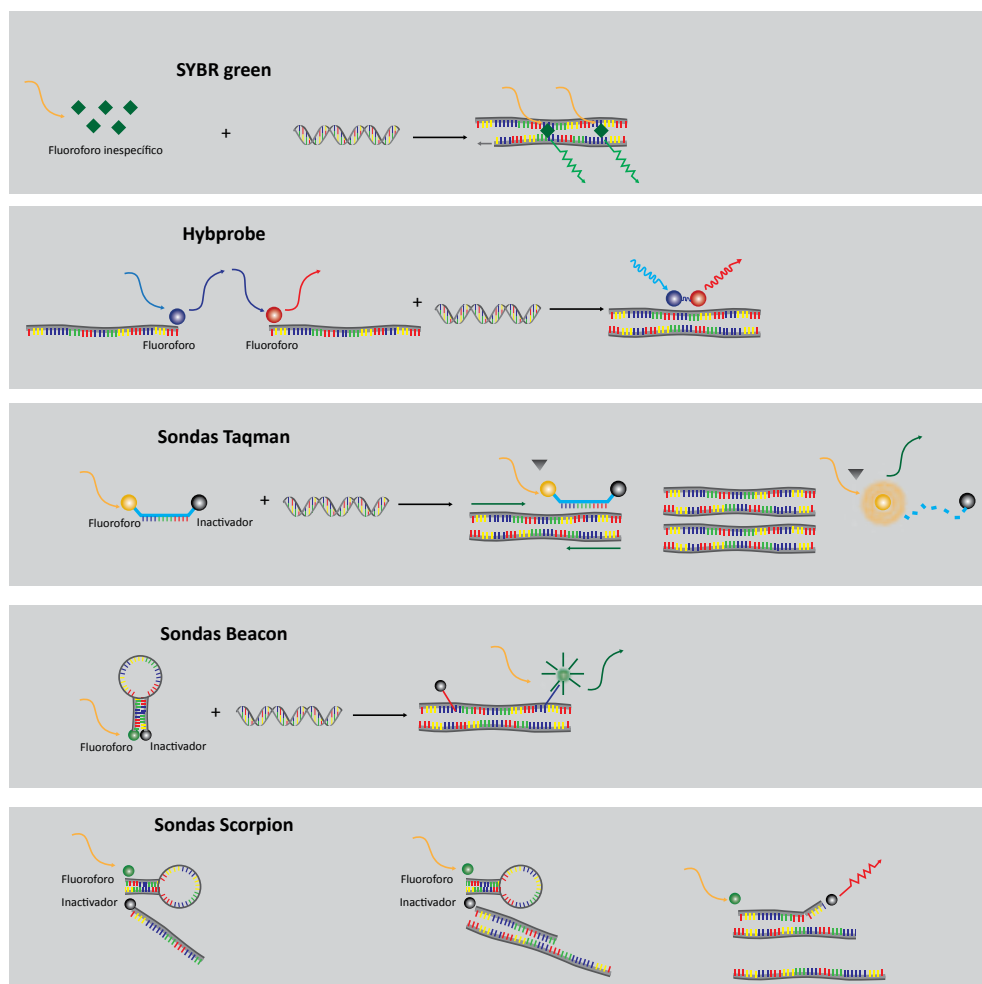


Figura 15. Fluoróforos y sondas fluorescentes para el seguimiento de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

Por su parte, las sondas *Molecular beacons* son cadenas de nucleótidos que presentan una estructura de tallo-bucle o horquilla de cabello, donde los seis últimos nucleótidos de cada extremo de la secuencia son complementarios entre sí y forman una cadena doble que se conoce como el tallo y una región central no complementaria en forma de bucle (ver figura 15). El fluoróforo y el inactivador se encuentran en los extremos 5' y 3' al igual que las sondas *Taqman*, lo que evita la emisión de luz, por desactivación estática

o desactivación por contacto, mientras la estructura tallo-bucle esté formada. La región central o el bucle de la sonda tiene una alta complementariedad por la secuencia de ADN que se va a amplificar, uniéndose a la hebra molde en la fase de hibridación sólo si es totalmente complementaria; la presencia de un sólo nucleótido no complementario en la cadena blanco lleva a que se prefiera la formación de la estructura de tallo-bucle y no la hibridación con la secuencia a amplificar. La unión de la sonda con el ADN permite que se separe el fluoróforo presente en el extremo 5' del inactivador que se encuentra en el extremo 3', lo que lleva a una emisión de luz mientras la sonda permanezca unida al ADN (ver [figura 15](#)) [24, 44]. La sonda es removida de la cadena molde en la fase de extensión, volviendo a la conformación de tallo bucle y quedando funcional para un nuevo ciclo. La ventaja en el uso de esta sonda es la posibilidad de utilizar sondas con diferentes fluoróforos que presenten variaciones mínimas para diferenciar la presencia de polimorfismos de un sólo nucleótido.

Por último, las sondas *Scorpion* están incorporadas en los cebadores específicos de la reacción, poseen la misma estructura tallo-bucle de las sondas *Molecular beacons*, tienen el fluoróforo en el extremo 5' y el inactivador en el extremo 3', que evita la emisión de luz por el mecanismo de desactivación estática, pero, se diferencia en que en el extremo 3' se adiciona el cebador a la secuencia de la sonda (ver [figura 15](#)). La fusión del cebador con la sonda evita la adición de una secuencia adicional a la prueba, y da una mayor velocidad y sensibilidad a la reacción [24, 44]. Durante el proceso, el cebador se une a la región blanco, lo que permite que se dé la extensión de la cadena complementaria sin afectar la conformación de la sonda. En el ciclo siguiente, la sonda se desnaturaliza e hibrida en las cadenas nuevas formadas; ya no sólo se une el cebador por complementariedad sino también la región que forma el tallo-bucle de la sonda, alejando de esta manera el fluoróforo del inactivador y permitiendo la emisión de luz, que será proporcional al número de moléculas presentes en cada ciclo (ver [figura 15](#)). La sonda es desplazada al completar cada ciclo de extensión, y reciclada para ser utilizada en el siguiente ciclo.

Utilidad clínica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

El uso de la biología molecular, en este caso la reacción en cadena de la polimerasa, es una herramienta esencial para la toma de decisiones en todas las etapas de la atención del paciente: la evaluación del riesgo, la detección, el diagnóstico, la estadificación y el pronóstico, la selección de la terapia, y el seguimiento en diferentes enfermedades (ver [tabla 4](#)). Actualmente hay muchos marcadores moleculares que se usan en la práctica médica, que aumentan día tras día a medida que se comprende la enfermedad desde la biología celular y molecular. En esta apartado, se mostrarán algunos ejemplos del diagnóstico molecular según las etapas de la atención del paciente, que van a ser ampliamente detallados en otras entregas del módulo de biología molecular de la revista Medicina & Laboratorio, y que sin lugar a dudas, la comprensión de los principios que las fundamentan y la utilidad clínica de cada una de ellas, van a hacer una diferencia fundamental en la atención al paciente, lo que generará nuevos desenlaces.

Tabla 4. Utilidad clínica de algunos marcadores moleculares				
Evaluación de riesgo	Tamizaje	Diagnóstico	Selección de la terapia	Seguimiento
Gen BRCA1	Virus del papiloma humano	Gen HFE	Gen BRAF	Gen de fusión BCR-ABL
Gen HFE	Gen HFE	Bacteria	Gen KRAS	Carga viral
Gen Factor V de Leiden	Resistencia bacteriana	Hongos	Gen Her/Neu2	CBFB/MYH11
Gen protrombina		Virus	Resistencia bacteriana	
Gen Septina 9 metilado		Gen de fusión BCR-ABL		
		Gen BCL1/BCL2		
		Inversión CBFB/MYH11		

Evaluación de riesgo

▪ Gen BRCA1

BRCA1 y BRCA2 son genes humanos que producen proteínas supresoras de tumores. Estas proteínas ayudan a la reparación del ADN dañado y, por tanto, desempeñan un papel esencial en asegurar la estabilidad del material genético de la célula. Cuando uno de estos genes está mutado o alterado de forma que la proteína que origina no se produce o no funciona correctamente, el daño del ADN no puede ser reparado adecuadamente; como resultado, las células están propensas a desarrollar alteraciones genéticas adicionales que pueden conducir al cáncer. Mutaciones heredadas específicas en los genes BRCA1 y BRCA2 aumentan el riesgo de cáncer de mama femenino y de ovario, y se han asociado con un mayor riesgo de varios tipos adicionales de cáncer [42, 43, 46], por lo que su detección temprana permite evaluar el riesgo de un paciente de presentar la enfermedad.

▪ Factor V Leiden y Protrombina II

Las mutaciones en los genes del factor V Leiden y de la protrombina son los factores de riesgo genético más frecuente para la trombosis venosa. La alteración de las proteínas asociadas a estos genes puede provocar estados de hipercoagulación. Estos genes pueden ser evaluados en individuos que tienen antecedentes médicos de trombosis venosa o en familias en las que existe una alta incidencia de la enfermedad. La identificación de portadores permite tomar medidas de prevención en individuos que presenten la mutación cuando estén sometidos a situaciones de riesgo como el embarazo, tratamiento con anticonceptivos, inmovilizaciones prolongadas, o para determinar el riesgo de infarto de miocardio [24, 47].

Tamizaje

■ Virus del papiloma humano

Hace unos 20 años, los investigadores descubrieron la relación entre el virus del papiloma humano (VPH) y el cáncer de cuello uterino. Ahora se sabe que de los 100 o más tipos genéticamente distintos del virus, unos 14 están asociadas con alto riesgo de cáncer de cuello uterino, y que sólo ocho de ellos son responsables de casi todos los casos. Debido a que los tipos de virus del papiloma humano son identificables por método moleculares, ha sido posible desarrollar pruebas para tamizaje de mujeres infectadas con los tipos de alto riesgo. La identificación de las mujeres con alto riesgo de padecer cáncer permite una adecuada guía en el seguimiento, lo que facilita la interpretación cuando los resultados de una citología cervico-vaginal convencional (prueba de Papanicolaou) no son concluyentes. La Sociedad Americana del Cáncer y otras sociedades profesionales líderes, recomiendan que las mujeres entre 21 y 65 años de edad deben recibir una prueba de Papanicolaou (u otra forma de prueba citológica) cada tres años, y las mujeres 30 a 65 años de edad, deben recibir además de la prueba citológica, una prueba de virus del papiloma humano cada cinco años [48].

Evaluación de riesgo, tamizaje y diagnóstico

■ Hemocromatosis

La hemocromatosis hereditaria es reconocida como un trastorno autosómico recesivo, asociado al gen HFE (inicialmente llamado HLA-H), el cual produce una proteína similar a una proteína del complejo mayor de histocompatibilidad clase I, pero que no se une ni presenta péptidos endógenos, y no se cree que tenga una función inmunológica. Se ha descrito que la proteína HFE interactúa con el receptor de la transferrina y modula la absorción intestinal de hierro en la dieta. Las mutaciones en HFE interfieren con esta función reguladora, lo que lleva a un exceso de la absorción del hierro y su almacenamiento en los tejidos. La evaluación molecular de las mutaciones de la proteína HFE puede servir para el tamizaje, el diagnóstico y el seguimiento de pacientes con alteraciones en el metabolismo del hierro [49, 50].

Diagnóstico y seguimiento

■ Enfermedades infecciosas

A medida que las técnicas moleculares son aceptadas y adaptadas en la comunidad médica, más y más microorganismos se detectan o caracterizan por métodos moleculares, convirtiéndose poco a poco en la prueba estándar, especialmente para microorganismos que son difíciles de cultivar o cuando se necesita un cultivo posterior para la identificación de resistencia a los medicamentos. Además, los métodos moleculares cuantitativos se han convertido en una ayuda imprescindible para el seguimiento en respuesta a la terapia, especialmente en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis C. Otros microorganismos que pueden ser evaluados actualmente por estas técnicas son: parvovirus humano B19, virus Epstein-Barr,

Toxoplasma gondii, citomegalovirus, virus herpes humano, *Mycobacterium tuberculosis*, entre otros [24, 42, 51, 52].

Seguimiento

■ K-ras, N-ras, B-raf y Her2/neu

Los protooncogenes K-ras, N-ras, B-raf y Her2/neu, son genes que desempeñan papeles críticos en la división, la diferenciación y la autodestrucción celular. Mutaciones en estos genes producen proteínas anómalas asociadas a la formación de neoplasias en el páncreas, el colon, el recto, el pulmón y otros tejidos del cuerpo. Actualmente se utiliza la detección de mutaciones específicas en estos genes para determinar la idoneidad del paciente para ciertas terapias en cáncer colorrectal y de pulmón [36, 53, 54]. Estas pruebas moleculares hacen parte de un número creciente de ejemplos de diagnóstico molecular que ayuda a la toma de decisiones de un médico sobre el tratamiento adecuado del cáncer.

Conclusiones

La biología molecular ha logrado generar rupturas en la forma de concebir la ciencia, pasando de una visión reduccionista, mecanicista y teleológica para la explicación biológica, a la búsqueda de conocimiento y herramientas que nos permitan generar aproximaciones complejas, sistémicas y con una mirada holística de los organismos, teniendo en cuenta cada nivel de interpretación (molecular, celular y tisular) y las relaciones que lo componen. Debido a la complejidad de las enfermedades, hay un número cada vez mayor de biomarcadores moleculares que son validados clínicamente para diferenciar a los subgrupos de poblaciones que tienen síntomas y cursos clínicos variables en la misma enfermedad. Las nuevas tecnologías están haciendo posible recopilar diferente información para caracterizar el estado de la enfermedad, el desarrollo de mejores alternativas de tratamiento para un paciente o en el caso de las enfermedades infecciosas, la identificación rápida de un patógeno específico. La aplicación práctica de estos métodos puede ser un gran reto debido a la complejidad de las tecnologías involucradas, pero estos desafíos están siendo soportados por la integración de métodos moleculares con tecnologías de la información y de análisis de datos a gran escala.

Los errores y aciertos del estudio del genoma humano han permitido el impulso vertiginoso del desarrollo de las ómicas y la biología de sistemas como herramientas teóricas e instrumentales para la interpretación de la complejidad del ser humano. La medicina de laboratorio en conjunto con la biología molecular empieza a asumir el reto de generar nuevos desenlaces ante una forma diferente de ver el proceso de la salud y la enfermedad, a su vez que da respuestas complejas ante los desafíos que durante siglos han sido incógnitas para la medicina. La biología molecular y la medicina introduce un conjunto de herramientas al laboratorio clínico que dan información rápida y precisa sobre la estructura molecular (ADN y ARN) de un paciente o muestra en particular, la cual puede ser utilizada para la prevención, diagnóstico y tratamiento de muchas enfermedades de base genética o enfermedades complejas. La introducción de la genómica por medio de la secuenciación y el acceso paulatino de otras ómicas en el laboratorio clínico abren un portafolio de posibilidades inimaginables para la medicina del siglo XXI.

Bibliografía

1. **Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, et al.** Molecular Cell Biology (ed 7). New York: W. H. Freeman and Company; 2012.
2. **Katsanis SH, Katsanis N.** Molecular genetic testing and the future of clinical genomics. *Nat Rev Genet* 2013; 14: 415-426.
3. **Watson JD, Crick FH.** Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953; 171: 737-738.
4. **Jackson DA, Symons RH, Berg P.** Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972; 69: 2904-2909.
5. **Arnheim N, Erlich HA, Horn GT, Mullis KB, Saiki RK, Scharf SJ.** Process for amplifying, detecting, and/or-cloning nucleic acid sequences. United States of America: Cetus Corporation; 1987.
6. **Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al.** Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
7. **Consortium IHGS.** Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431: 931-945.
8. **Chen R, Snyder M.** Promise of personalized omics to precision medicine. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2013; 5: 73-82.
9. **Guttmacher AE, Collins FS.** Genomic medicine--a primer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1512-1520.
10. **Feero WG, Guttmacher AE, Collins FS.** Genomic medicine--an updated primer. *N Engl J Med* 2010; 362: 2001-2011.
11. **Green ED, Guyer MS.** Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside. *Nature* 2011; 470: 204-213.
12. **Wilkins MH, Stokes AR, Wilson HR.** Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature* 1953; 171: 738-740.
13. **Watson JD.** Molecular Biology of the Gene (ed 5ta). USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003.
14. **Marx V.** Epigenetics: Reading the second genomic code. *Nature* 2012; 491: 143-147.
15. **Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA.** Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429: 457-463.
16. **Esteller M.** Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 861-874.
17. **Tyers M, Mann M.** From genomics to proteomics. *Nature* 2003; 422: 193-197.
18. **Caie PD, Schuur K, Oniscu A, Mullen P, Reynolds PA, Harrison DJ.** Human tissue in systems medicine. *FEBS J* 2013; 280: 5949-5956.
19. **Kitano H.** Computational systems biology. *Nature* 2002; 420: 206-210.
20. **Hengesbach L, Gerlach JA.** Specimen Collection, Handling, and Processing. In: Hu P, Hedge MR, Alan P, eds. *Modern Clinical Molecular Techniques*. New York, US: Springer; 2012: 3-10.
21. **Lahiri DK, Schnabel B.** DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. *Biochem Genet* 1993; 31: 321-328.
22. **Wang H.** DNA/RNA Isolation and Quantitation. In: Hu P, Hedge MR, Alan P, eds. *Modern Clinical Molecular Techniques*. New York, US: Springer; 2012: 11-22.
23. **Zheng YL, Amin ND, Hu YF, Rudrabhatla P, Shukla V, Kanungo J, et al.** A 24-residue peptide (p5), derived from p35, the Cdk5 neuronal activator, specifically inhibits Cdk5-p25 hyperactivity and tau hyperphosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 2010; 285: 34202-34212.
24. **McPherson RA, Pincus MR eds.** Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods (ed 22). Philadelphia, US: Elsevier; 2011.
25. **Valencia A, Coffee B.** In Vitro Amplification Methods in Molecular Diagnostics In: Hu P, Hedge MR, Alan P, eds. *Modern Clinical Molecular Techniques*. New York, US: Springer; 2012: 49-66.
26. **Chien A, Edgar DB, Trela JM.** Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 1976; 127: 1550-1557.
27. **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
28. **Weier HU, Gray JW.** A programmable system to perform the polymerase chain reaction. *DNA* 1988; 7: 441-447.
29. **Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS.**

- General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl* 1993; 3: S30-37.
30. **Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT.** Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245: 154-160.
31. **Xiong AS, Yao QH, Peng RH, Li X, Fan HQ, Cheng ZM, et al.** A simple, rapid, high-fidelity and cost-effective PCR-based two-step DNA synthesis method for long gene sequences. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: e98.
32. **Wang AM, Doyle MV, Mark DF.** Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 9717-9721.
33. **Williams PM.** The beginnings of real-time PCR. *Clin Chem* 2009; 55: 833-834.
34. **Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM.** Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6: 986-994.
35. **Ginzinger DG.** Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002; 30: 503-512.
36. **Perez EA, Cortes J, Gonzalez-Angulo AM, Bartlett JM.** HER2 testing: current status and future directions. *Cancer Treat Rev* 2014; 40: 276-284.
37. **Rodriguez-Gonzalez FG, Mustafa DA, Mostert B, Sieuwerts AM.** The challenge of gene expression profiling in heterogeneous clinical samples. *Methods* 2013; 59: 47-58.
38. **Mayer G, Muller J, Lunse CE.** RNA diagnostics: real-time RT-PCR strategies and promising novel target RNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2011; 2: 32-41.
39. **Luu MH, Press RD.** BCR-ABL PCR testing in chronic myelogenous leukemia: molecular diagnosis for targeted cancer therapy and monitoring. *Expert Rev Mol Diagn* 2013; 13: 749-762.
40. **Ceulemans S, van der Ven K, Del-Favero J.** Targeted screening and validation of copy number variations. *Methods Mol Biol* 2012; 838: 311-328.
41. **Van Der Pol B.** Cobas(R) 4800: a fully automated system for the detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. *Expert Rev Mol Diagn* 2013; 13: 131-140.
42. **Sweet KM, Michaelis RC.** The Busy Physician's Guide To Genetics, Genomics and Personalized Medicine. New York, USA: Springer; 2011.
43. **Hu P, Hedge MR, Alan P eds.** Modern Clinical Molecular Techniques. New York, USA: Springer; 2012.
44. **Didenko VV.** DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques* 2001; 31: 1106-1116, 1118, 1120-1101.
45. **Mangasser-Stephan K, Tag C, Reiser A, Gressner AM.** Rapid genotyping of hemochromatosis gene mutations on the Light-Cycler with fluorescent hybridization probes. *Clin Chem* 1999; 45: 1875-1878.
46. **Balmana J, Diez O, Rubio IT, Cardoso F, Group EGW.** BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2011; 22 Suppl 6: vi31-34.
47. **Spector EB, Grody WW, Matteson CJ, Palomaki GE, Bellissimo DB, Wolff DJ, et al.** Technical standards and guidelines: venous thromboembolism (Factor V Leiden and prothrombin 20210G >A testing): a disease-specific supplement to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories. *Genet Med* 2005; 7: 444-453.
48. **Smith RA, Cokkinides V, Eyre HJ.** Cancer screening in the United States, 2007: a review of current guidelines, practices, and prospects. *CA Cancer J Clin* 2007; 57: 90-104.
49. **European Association For The Study Of The L.** EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol* 2010; 53: 3-22.
50. **Bacon BR, Adams PC, Kowdley KV, Powell LW, Tavill AS, American Association for the Study of Liver D.** Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2011; 54: 328-343.
51. **Maurin M.** Real-time PCR as a diagnostic tool for bacterial diseases. *Expert Rev Mol Diagn* 2012; 12: 731-754.
52. **Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al.** Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 165-256.
53. **Ayoola A, Barochia A, Belani K, Belani CP.** Primary and acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer: an update. *Cancer Invest* 2012; 30: 433-446.
54. **Van Cutsem E, Nordlinger B, Cervantes A, Group EGW.** Advanced colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for treatment. *Ann Oncol* 2010; 21 Suppl 5: v93-97.