

UNIVERSIDAD DEL SURESTE

Licenciatura en Medicina Humana

Materia:

Biología Molecular

Ensayo:

Patología Molecular & Terapia Génica

Docente:

QFB. Hugo Nájera Mijangos

Alumno:

Víctor Eduardo Concha Recinos

Semestre y Grupo:

4° "A"

Comitán, Chiapas a; 03 de Diciembre de 2020.

Introducción:

Este trabajo tiene como objetivo aclarar los temas de la patología molecular y la terapia génica, ya que ambas técnicas diagnósticas son de suma importancia en el desarrollo de nuestros conocimientos como estudiantes de medicina, y no solo en el proceso, si no que como tal en el ámbito laboral médico. Son estudios diagnósticos que nos amplían el panorama para poder diagnosticar con mayor sencillez pero con gran probabilidad una enfermedad en específico. Los avances científicos y tecnológicos, nos han sido de gran aporte para la medicina y su aplicación ya que gracias a estos podemos llegar mucho más rápido a la enfermedad del paciente y por lo tanto al tratamiento, así pues prolongando el estado de salud del paciente. Por lo regular ambas técnicas diagnósticas moleculares que analizaremos en este trabajo son para patologías neoplásicas y por microorganismos y que estos por lo regular sean virus. Estos genes pueden ser llevados a la célula por medio de los llamados vehículos o "vectores", denominados así por su similitud con los agentes biológicos que transmiten enfermedades. El término vector anteriormente se utilizaba sólo para designar a los plásmidos o a los virus modificados que se utilizaban como vehículos que transportaban el gen deseado a una célula. Hablando de la terapia génica, sabemos bien que existen 2 tipos, una es la de células somáticas y otra es la de células germinales; la de células somáticas busca introducir genes a las células somáticas y así eliminar las consecuencias clínicas de una enfermedad genética heredada o adquirida y la de células germinales, aún está siendo evaluada ya que no se cuenta con la tecnología necesaria para ponerla en práctica, pero aun así dejando atrás a los inmuno-ensayos y a las técnicas histoquímicas y de cultivo, ya que estas eran técnicas que se utilizaban para el diagnóstico patológico pero eran exámenes críticos para el diagnóstico de las infecciones, las respuestas inmunes individuales varían, y en muchos casos la detección de un anticuerpo o un antígeno dependen de la cantidad o "carga" del agente infeccioso presente en un tejido específico.

Patología Molecular & Terapia Génica

Métodos para la detección molecular

Se comienza con la preparación de muestras clínicas, que es donde se recomienda el uso de células mononucleares, provenientes de sangre periférica, pero no omitiendo que se puede hacer uso de biopsias y de extracciones de tejido en autopsias, frescas, congeladas o fijadas para distintos métodos. “En general, la



mayor parte de las muestras clínicas fijadas para examen histológico en varios fijadores biológicos pueden usarse para el análisis del DNA”. (Figuerola, 1991) Para la hibridización in situ de células y tejidos congelados, nos menciona este artículo que se hace uso de paraformaldehído al 2% con 0.1 M de lisina en solución salina buferada con fosfato

Extracción del DNA y RNA

Para la preparación del DNA de plásmidos, se hace uso de una alta calidad de DNA purificado siguiendo la preparación de sondas. Se dice que una ventaja grande que existe dentro de la técnica es la remoción de muchos contaminantes del DNA, que pudieran interferir con la digestión de endonucleasas de restricción y de otros procedimientos utilizados en la preparación de dichas sondas. Un procedimiento simplificado del cual nos habla este artículo es que para la preparación del DNA con un alto peso molecular de muestras clínicas usan condiciones de alta salinidad para quitar las proteínas. El procedimiento elimina la necesidad de usar fenolcloroformo. “La concentración de proteínasa K se aumenta a 100 mg/ ml para los tejidos difíciles de digerir. Después de la lisis celular, se añade Na Cl 6 M y los restos de membranas se remueven por centrifugación”. (Figuerola, 1991)

Algo muy importante que tenemos que tener en cuenta es que este método es particularmente útil para poder aislar el DNA de un gran número de muestras y de pequeños volúmenes de sangre de infantes, biopsias, aspiraciones con aguja pequeña de fluido amniótico o cerebro-espinal, conteniendo muy pocas células.

Selección de Sondas y Estrategias de Marcado

La sonda se prepara a partir del DNA o del RNA sin que importe el sistema de marcado o la detección usada, esto para una secuencia genética altamente conservada en el agente infeccioso o bien que represente a una mutación, sustitución, ó amplificación de un gen celular normal en una malformación genética. El clonaje de DNA o C-DNA es realizado a partir de transcripciones específicas de RNA en un plásmido que se multiplica en un vector bacteriano. "Tanto las sondas radioactivas y no radioactivas de DNA pueden prepararse usando d-CTP ó d-ATP marcados y añadiendo los cuatro nucleótidos (d-NTP) y la DNA polimerasa I." (Figueroa, 1991) Aun que se pueden preparar las sondas de DNA por el método de Nick translación, el cual es un método que consiste en producir pequeños cortes mediante el tratamiento con DNA-sa al mismo tiempo que marca al DNA, la eficacia del marcaje es baja y puede inhibirse por contaminantes presentes en el DNA o bien, por el tiempo y la temperatura de la síntesis.

Con la invención de sintetizadores de DNA es posible ahora producir pequeñas cadenas únicas de DNA (oligonucleótidos) para casi cualquier secuencia conocida. (Figueroa, 1991) Aun que se dice que el uso de sondas de oligonucleótidos aumentará la sensibilidad de la detección, esto porque las sondas hibridan en una secuencia específica pequeña con mayor eficiencia que los fragmentos grandes de DNA clonado por influencia de los plásmidos. No omitiendo que se han desarrollado algunos métodos mucho más sensibles para la detección, esto por una variedad de procedimientos moleculares que usan sondas de tipo quemiluminiscentes y equipos de luminometría, sin embargo, pero pues esto aún no se ha puesto en práctica aunque no se descarta la idea de que su uso se encuentre no muy lejano, debido a los avances tecnológicos que se han suscitado.

Hibridización Molecular y Sistemas de Detección

Existen distintos métodos dentro de la hibridización molecular, los cuales se consideran como básicos para el tejido y que se hace uso de sondas específicas de DNA o de RNA, los cuales son:

- Hibridización de DNA ó RNA de los tejidos con sondas de DNA ó RNA en solución.
- Hibridización de DNA ó RNA en membranas de nitrocelulosa o en membranas de nylon después de la electroforésis en gel y transferencia a una membrana ("Southern blot" para DNA y "Northern blot" para RNA) ó bien directamente mediante la hibridización llamada "dot blot" o "slot blot" (manchas en círculo o en línea).

- Hibridización directamente en las células y tejidos por el método de hibridización in situ.

Aplicaciones de las técnicas moleculares

Los avances que se ha demostrado últimamente en el DNA recombinante como son el clonaje, la secuenciación y otras técnicas moleculares nos han permitido identificar genes de forma más específica así como los productos proteicos y comprender rutas moleculares en la progresión de la enfermedad, tanto infecciosas como neoplásicas, por lo regular que sean genéticas y que no exista definido sus agentes etiológicos, pero como ya he mencionado antes; por los avances tecnológicos nos han ampliado el panorama. “Así en gran número de enfermedades genéticas, desórdenes metabólicos y tipos de cáncer que antes se diagnosticaban en base a defectos cromosómicos, historia familiar, y productos anormales de metabolismo, ahora se diagnostican usando sondas moleculares específicas”. (Figueroa, 1991)

Terapia génica

La terapia génica es aquella que involucra la manipulación genética del organismo humano, y por lo tanto podría ser utilizada, en principio, en cualquier enfermedad que haya surgido por la modificación de un factor genético, ya sea de tipo heredado, como las enfermedades monogénicas con patrón de herencia mendeliano; como las enfermedades con herencia multifactorial (en las que hay una influencia de los genes y el ambiente, como en la hipertensión, la diabetes y la enfermedad coronaria) o de tipo adquirido (cáncer, SIDA, artritis etc.). También podría utilizarse en el mejoramiento de los procesos de curación y regeneración tisular, y en el tratamiento de enfermedades neurológicas degenerativas como la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer. “El primer protocolo clínico aprobado por la FDA para el uso de la TG fue el utilizado en el tratamiento de la deficiencia en adenosín deaminasa”. (Austin, 1998)

Se dice que existen, en teoría, dos tipos de terapia génica: la terapia génica de células somáticas y la terapia génica de células germinales, aunque sólo la primera está siendo desarrollada actualmente. La de tipo somática busca introducir los genes a las células somáticas y así eliminar las consecuencias clínicas de una enfermedad genética heredada o adquirida. Las generaciones futuras no son afectadas porque el gen insertado no pasa a ellas. Y la de tipo germinal sólo existe como posibilidad, pues no se cuenta con la tecnología

necesaria para llevarla a cabo como ya había mencionado antes. Además ha sido proscrita por la comunidad científica y por organismos internacionales por sus implicaciones éticas.

Dentro de las aproximaciones que se tienen para el tratamiento del cáncer estaba involucrada la destrucción de células cancerosas con agentes quimioterapéticos, radiación o cirugía. La terapia génica es una cuarta estrategia que en algunos casos ha logrado disminuciones en el tamaño de los tumores sólidos que alcanzan entre un 50% y un 100% y los principales métodos que utiliza la terapia génica del cáncer son:

1. Aumento de la respuesta inmune celular antitumoral.
2. Introducción de genes activadores de drogas dentro de las células tumorales o terapia de genes suicidas.
3. Normalización del ciclo celular.
4. Manipulación de las células de la médula ósea.
5. Incremento del efecto circundante o "*bystander effect*".
6. Uso de ribozimas y tecnología antisentido o "*antisense*".

Dentro de las aproximaciones que se tienen para poder tratar al VIH, se sabe que se trastorna el dogma central de la biología debido a la transcripción inversa de su RNA genómico y su integración al azar del ADN viral producido en el ADN del huésped, haciendo al provirus un rasgo heredable de la célula, que se mantiene mientras ésta exista. Siendo los principales métodos que utiliza:

1. Detener la replicación del HIV dentro de las células infectadas.
2. Impedir que el virus infecte a las células sanas.

Conclusión:

Los diagnósticos moleculares que se realizan para el seguimiento de una enfermedad dependerán primordialmente de la disponibilidad de sondas específicas, las sondas de DNA y RNA proveen sistemas específicos y sensibles de detección, comparable o mejor a las técnicas convencionales de serología, cultivo, e histoquímica, ya que en el medio no se cuenta con gran cantidad de ellas y se recurre a los métodos convencionales o tradicionales por así decirle a las técnicas antes usadas. Estas nuevas técnicas nos han permitido avanzar grandemente en el estudio, diagnóstico y tratamiento de los pacientes, haciendo así que se les alargue el pronóstico para la vida de los pacientes que cursan con patologías en específico.

Bibliografía

Austin, E. D. (1998). La terapia génica y sus aplicaciones. *SciELO*, 6.

Figuroa, M. (1991). Patología Molecular y Diagnostico de Enfermedades Infecciosas. *Revista Médica Hondureña*, 16.