

INFECCIOSAS APARICIÓN DE LIPODISTROFIA

Identifican nuevos genes alterados por los ART durante la adipogénesis

■ DM Nueva York Investigadores del Departamento de Microbiología de la Universidad de Padua, en Italia, han identificado nuevos genes alterados o modulados por los inhibidores de la proteasa (IP) y los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos durante la adipogénesis. El trabajo, coordinado por Giorgio Palú, se publica en el último número de *AIDS*.

Con el fin de analizar la patogénesis de la lipodistrofia asociada a la terapia antirretroviral en pacientes con infección por el VIH, los investigadores analizaron sus efectos en la diferenciación adipocítica.

Perfil genético

Mediante el uso de *microarrays* de ADN y RT-PCR cuantitativa, los autores analizaron el perfil de expresión genética de 3T3-L1 preadipocitos tratados con análogos de nucleósidos (lamivudina, zidovudina, estavudina y zalcitabina) e IP (indinavir, saquinavir y lopinavir) durante el pro-

ceso de maduración a adipocitos.

Según los resultados, los IP inhiben significativamente la diferenciación de adipocitos, mientras que los análogos de nucleósidos tienen efectos moderados en la adipogénesis. El análisis del perfil de expresión genética mostró que el tratamiento con análogos de nucleósidos modula la expresión de factores de transcripción como el *Aebp1*, *Pou5f1* y *Phf6*, que pueden tener un papel clave en la determinación del fenotipo de los adipocitos.

Los IP también modulan la expresión frente a la inhibición de la diferenciación de los adipocitos, provocando tanto una sobreexpresión del gen *Wnt10a* como una infraexpresión de la expresión de otros genes importantes en la codificación de factores de transcripción de adipocitos y de marcadores específicos de células grasas, como la adiponectina o la leptina.

■ (*AIDS* 2006; 20 (13): 1691-1705).

ONCOLOGÍA MEDIANTE EL USO DE RAYOS X

Obtienen imágenes de la lucha entre LTag y p53

■ DM Nueva York Un equipo de investigadores del Departamento de Biología Molecular de la Universidad del Sur de California y del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Pittsburgh, en Estados Unidos, ha obtenido, mediante rayos X, las primeras imágenes que muestran la batalla entre la vida y la muerte que se produce entre la proteína LTag, promotora de procesos tumorales, y una proteína tumoresupresora llamada p53. El hallazgo se publica en el último número de *Genes & Development*.

"La p53 es un supresor de tumores muy importante que está mutado en la mayoría de los casos de cáncer. Si se presenta gran cantidad de p53, puedes anular el antígeno T", han explicado Xiaojiang Chen y James Pipas.

El equipo de Chen ha descrito la interacción entre LTag y p53 mediante la

cristalización del complejo de un LTag y seis moléculas p53, y un total de más de 5.000 átomos entre ellos.

Cada LTag ata por sí misma un grupo de seis moléculas p53, inhibiendo su capacidad para suprimir los tumores. La proteína p53 lucha mediante la prevención de la réplica del virus que produce LTag, conocido como una oncoproteína por su función en el crecimiento del cáncer.

Antígeno

En definitiva, "el virus conoce de algún modo la importancia inhibidora de la molécula p53, y mediante la oncoproteína LTag interactúa físicamente y cambia su conformación para eludir", ha señalado Chen.

Finalmente, si el virus tiene éxito, se inicia el proceso que da pie al desarrollo de los tumores.

TRIBUNA SUSTITUIRÁ COMPLETAMENTE A ALGUNOS MÉTODOS DE DETECCIÓN DE PATÓGENOS

La PCR amplía sus dominios

► El autor de la tribuna analiza la evolución que ha sufrido la técnica diagnóstica de reacción en cadena de la polimerasa, que nació como una herramienta de biología molecular y que poco a poco ha ido ampliando sus indicaciones, siendo clave en la identificación de virus y retrovirus.



EDUARDO LÓPEZ-COLLAZO

Unidad de Investigación del Hospital Universitario La Paz, de Madrid



La sensibilidad de la técnica es mil veces mayor que la que se obtiene con los cultivos, y los resultados de ambas pruebas se correlacionan, aunque no es necesario esperar los siete días que necesitan los cultivos



La PCR también se puede utilizar en el diagnóstico prenatal, ya que se ha identificado la presencia de ADN fetal en la circulación de la madre, lo que permite extraer el material genético

Desde que Kary B. Mullis inventara la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), a principios de la década de 1980, en el horizonte de este campo ha ido apareciendo una gran cantidad de aplicaciones al diagnóstico clínico. Esta técnica ha tenido tanta influencia en el desarrollo de la biología y, por consiguiente, en la medicina, como el descubrimiento de la estructura de doble hélice del material genético (ADN). El hecho de poder amplificar mínimas cantidades de ADN de manera específica ha propiciado su aplicación en la detección de microorganismos difíciles de cultivar, infecciones virales recientes, polimorfismos que causan enfermedades y marcadores de cáncer, entre otras muchas aplicaciones. Hoy por hoy, la medicina no puede caminar sin ella.

Explotando la función original de las polimerasas -enzimas cuya actividad es copiar secuencias de ADN-, esta técnica nos permite realizar un fotocopiado molecular de una parte del material genético. Por ello, la presencia de ínfimas cantidades de una secuencia específica, como por ejemplo la secuencia que caracteriza a un virus, se puede amplificar hasta hacerla visible y, por lo tanto, detectable. En un principio la PCR sólo era aplicable a la detección de ADN; sin embargo, utilizando un paso previo y con ayuda de las retrotranscriptasas, podemos detectar también ARN, que es el material genético presente en los llamados retrovirus, como el VIH o la hepatitis C. Esta variación es conocida como RT-PCR (*Retrotranscriptase Polymerase Chain Reaction*).

La amplificación de una porción del material genético perteneciente a un microorganismo o a un virus nos informa solamente de la presencia o no de esta infección en el paciente analizado. Esto último se conoce como PCR cualitativa. Sin embargo, si se monitoriza el proceso de amplificación de la secuencia en cuestión a tiempo real, podemos cuantificar la cantidad de material genético que está presente en la muestra. La Q-PCR en tiempo real nos posibilita no sólo conocer la presencia de la infección sino también cuantificar el número de copias existentes, convirtiéndose en instrumento crucial para la determinación de la carga viral. Por otra parte, la posibilidad de poder amplificar varias secuencias específicas de un mismo espécimen (multi-PCR) nos aporta una información completa de la presencia de la infección.

Nuevas indicaciones

Es evidente que esta herramienta, que en principio se entendió como otra más de la biología molecular, tiene un amplio espectro de aplicación en el diagnóstico. En el campo de la microbiología, la PCR está llamada a sustituir completamente a gran cantidad de los métodos actuales de detección de agentes patógenos. No sólo gana, por amplia diferencia, en cuanto a la posibilidad de detectar la presencia de microorganismos difíciles de cultivar; también facilita tener resultados fiables en un intervalo de tiempo corto -horas-, mientras que los cultivos necesitan días.

En la actualidad se han desarrollado ensayos de PCR para la detección de *Listeria*, *Legionella*, *Borrelia*, *Leptospira*, *Chlamydia*, *Neisseria* y *Treponema*, entre otros. Los resultados obtenidos por PCR han demostrado correlacionar perfectamente con la información que aportan los cultivos, con la diferencia de que, para estos últimos, se tuvo que esperar unos siete días, mientras que los resultados de la PCR se obtu-

vieron en horas. Cabe destacar que la sensibilidad de esta técnica es mil veces mayor que la que tiene un cultivo. Otras aplicaciones interesantes, y cada vez más extendidas, son la determinación de la resistencia a antibióticos de bacterias aisladas de pacientes y la detección de parásitos tales como *Toxoplasma*, *Trypanosoma* y *Cryptosporidium*.

Cáncer y virus

En el diagnóstico del cáncer la aplicación de la PCR ha sido esencial para determinar la presencia de marcadores específicos del desarrollo de esta enfermedad, así como la aparición de polimorfismos que inducen eventos oncológicos. Un ejemplo claro lo constituyen los niveles de expresión de factores como HER-2 y la topoisomerasa IIa, genes importantes en el desarrollo del cáncer de mama, fácilmente detectables por PCR en tiempo real. Sus niveles indican una mala prognosis para el paciente en cuestión.

Por otra parte, la localización de mutaciones en genes como el p53 es otra de las aplicaciones de la PCR al diagnóstico en el campo de la oncología. Sin embargo, una de las áreas donde esta técnica ha tenido mayor impacto es en la detección y cuantificación de virus y retrovirus. Tres factores han contribuido a ello: son agentes patógenos con un material genético muy simple, el aislamiento de su ADN o ARN es sencillo y, por último, el diagnóstico por cultivo es difícil y laborioso.

Una larga lista de ensayos de PCR se ha establecido para detectar virus. En este apartado merecen una especial mención los retrovirus que provocan el sida, ya que la PCR ha contribuido a eliminar el periodo ventana en su detección. Los métodos más tradicionales, basados en la aparición de anticuerpos o la detección de proteínas del virus (Elisa o Western Blot), necesitan unos niveles de contaminación elevados o un periodo de incubación largo (de tres a seis meses desde la infección).

No obstante, con la PCR se puede reconocer su presencia transcurridas 48-72 horas de la contaminación, siendo más prudente esperar una semana para eliminar posibles falsos negativos. Por otra parte, la posibilidad que brinda la cuantificación de las copias existentes ayuda en el ajuste del tratamiento. La precisión de la PCR logra diferenciar la presencia de distintos subtipos de un mismo virus cuya "aparición" es indistinguible por métodos más clásicos.

Otros campos de aplicación de esta técnica son las enfermedades neurodegenerativas y el diagnóstico prenatal. Mientras que en el primer grupo el uso de la PCR se circunscribe a la detección de polimorfismos que sirven para la clasificación de este tipo de enfermedades, en el caso del diagnóstico prenatal se aplica para identificar posibles fallos genéticos en los fetos. Recientemente se ha abierto una amplia gama de posibilidades para el diagnóstico no invasivo prenatal usando la PCR, debido a que se ha identificado la presencia de ADN fetal en la circulación de la madre, posibilitándose la extracción de material genético fetal desde el plasma materno.

La precisión y fiabilidad de esta técnica ha eliminado el antiguo temor que suscitaba la aparición de falsos positivos/negativos. Sus múltiples y muy variadas posibilidades nos hacen recomendar el estudio de las peculiaridades de cada diagnóstico donde se aplica la PCR, tendiendo otro puente de unión entre la biología molecular y el diagnóstico clínico.